Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor Professor Dr. med. H. E. Bock

Zur Entstehung doppelbrechender Strukturen im Leukocyten.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gudrun Gampe
aus Haida / Nordböhmen

1965

8581

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor : Professor Dr. med H.E. Bock

Zur Entstehung doppelbrechender Strukturen im Leukocyten.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gudrun Gampe
aus Haida/Nordböhmen

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Dekan : Professor Dr. med. Schulte
1. Berichterstatter : Professor Dr.med. H.P. Missmahl
2. Berichterstatter : Professor Dr.med. H.E. Bock

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0039

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Material und Methode	1 - 6
Untersuchungsergebnis	
1.) Morphologie der doppelbrechenden Strukturen in den Leukocyten des peripheren Blutes nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau	7 - 10
2.) Untersuchungen über den Einfluß wechselnder Farbstoffkonzentration und wechselnder Färbezeit am Ausstrichpräparat	10 - 21
3.) Untersuchungen über den Färbevorgang in der Kammer	21 - 27
4.) Morphologie der doppelbrechenden Granula in den verschiedenartigen Leukocyten	27 - 30
5.) Auszählung der doppelbrechenden Strukturen an supravital mit Toluidinblau gefärbten granulierten Leukocyten	30 - 57
6.) Untersuchungen über den Einfluß von Ribonuclease auf die doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der weißen Blutkörperchen	58 - 61
7.) Auszählung der doppelbrechenden Strukturen an supravital mit Toluidinblau gefärbter granulierten Leukocyten nach Zusatz von Ribonuclease	62 - 65

8.) Berechnung der Signifikanz des Unterschiedes der Anzahl doppelbrechender Körnchen zwischen Leukocyten mit und ohne Ribonucleasebehandlung 65 - 69

9.) Beeinflußbarkeit der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten durch äußere Einwirkungen 70 -

10.) Untersuchung der an gequetschten Zelkernen auftretenden Doppelbrechung 71 - 72

Diskussion 73 - 79

Zusammenfassung 80 - 81

Literaturverzeichnis 82 - 83

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen an Blutzellen wurden bisher kaum durchgeführt. F.O. S C H M I D T und Mitarbeiter untersuchten wohl eingehend die Erythrocyten und konnten aus deren Untersuchungen wesentliche Schlüsse auf den Aufbau der Membran derselben ziehen, insbesondere auf das hier vorhandene Proteinlipoidgefüge. Über Untersuchungen an Leukocyten ist bisher in der Literatur nicht berichtet worden. Dies hängt sicherlich damit zusammen, daß an diesen Zellen im ungefärbten Zustand und bei der üblichen Anfärbung nach P a p p e n h e i m keine Doppelbrechung beobachtet werden kann.

Aufgabe der hier vorliegenden Untersuchungen war es zu überprüfen, ob durch Einlagerung eines doppelbrechenden und dichroitischen Farbstoffes in gerichtete Strukturen der Leukocyten Anisotropie in diesen Zellen erzeugt werden kann. Zur Klärung dieser Frage wurden die folgenden Versuche durchgeführt :

M a t e r i a l u n d M e t h o d e

Als Untersuchungsmaterial wurde Venenblut benutzt, das mit Natrium-Citrat bzw. Heparin ungerinnbar gemacht wurde. Im Einzelnen setzten wir 4 ml Blut 1 ml 3.8% Natrium-Citrat-Lösung zu bzw. 5 ml Blut 0.01 ml Heparinlösung, welche in 1 ml 5000 I.E. Heparin enthielt.

Als Farbstoff wurde 0.5% wäßrige Toluidinblaulösung benutzt.

Sämtliche Färbungen wurden als Supravitalfärbung durchgeführt. Ich setzte dabei dem Blut innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Entnahme Toluidinblau zu und ließ dieses Gemisch bei Zimmertemperatur stehen. Nach Abschluß der Färbung wurden Ausstriche auf Objektträgern angefertigt.

Die mikroskopischen Beobachtungen erfolgten mit einem Polarisationsmikroskop (Leitz Biopol), das mit einem Immersionsobjektiv 90 : 1 A = 1.35 ausgerüstet war. Zur Unterscheidung von positiver bzw. negativer Doppelbrechung bezüglich der Richtung einer untersuchten Struktur verwandte ich den elliptischen Kompensator nach Brace-Köhler von $\lambda/16$.

Zunächst war zu klären, ob durch Supravitalfärbung mit Toluidinblau an den Leukocyten des peripheren Blutes Doppelbrechung erzielt werden kann und welche Färbedauer zur Erzeugung von optischer Anisotropie in Leukocyten geeignet ist. - Gleichzeitig wurde untersucht, ob zwischen dem mit Natrium-Citrat bzw. Heparin ungerinnbar gemachten Blut Unterschiede auftreten.

Ich ging dabei sowohl für das mit Natrium-Citrat als auch mit Heparin ungerinnbar gemachte Blut folgendermaßen vor :

Zu 1 ml Blut wurden

0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6 ml

Farbstofflösung zugesetzt und nach jeweils

2; 10; 20; 40; 60; 90 Minuten

sowie

2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 24 Stunden

mehrere Ausstriche angefertigt.

Um den Färbevorgang im Einzelnen beobachten zu können, wurde 1 Tropfen des frisch mit Farbstoff versetzten Blutes auf einen Objektträger gebracht und das Blut mit einem Deckglas bedeckt. Die Austrocknung wurde verhindert, indem ich das Deckglas mit einem auf Kunstharzbasis aufgebauten Klebstoff (UHU, Fa. UHU-Werk H.u.M.Fischer, Bühl/Baden) umrandete. Auch bei diesen Untersuchungen verwandte ich unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen. Ich setzte dabei zu 2 ml Blut jeweils 0.1; 0.2 und 0.4 ml der Farbstofflösung zu. Die einzelnen Präparate wurden über mehrere Stunden im Mikroskop beobachtet.

Nachdem sich bei den bisher genannten Untersuchungen regelmäßig an den Leukocyten Doppelbrechung erzielen ließ, wurde diese näher analysiert. Hierbei ergab sich die Notwendigkeit, eine Klassifizierung der einzelnen doppelbrechenden Strukturen in den Leukocyten durchzuführen. Zur Kontrolle, in welchem Verhältnis die einzelnen doppelbrechen-

den Strukturen zueinander stehen, wurde das Blut von 20 männlichen und 20 weiblichen gesunden Probanden untersucht. - Dazu wurden jeweils 4 ml Venenblut entnommen, dem 1 ml Natrium-Citrat zugesetzt wurde. Zur Färbung wurde zu 1 ml des ungerinnbar gemachten Blutes 0.2 ml Toluidinblau zugegeben. Nach einer Stunde wurden hiervon Ausstriche angefertigt.

Ferner machte ich die Feststellung, daß bei Zusatz von 0.2 ml Ribonucleaselösung zu 1 ml des frisch entnommenen Blutes ein vermehrtes Auftreten der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten des peripheren Blutes gegenüber dem Protoplasma der Leukocyten von Venenblut, das nur mit Natrium-Citrat versetzt wurde, zu beobachten ist.

Zur Feststellung der Richtigkeit dieser Beobachtung, wurde das Blut von 16 Probanden untersucht, indem ich jeweils 0.8 ml Venenblut entnahm, dem 0.2 ml Ribonucleaselösung bzw. 0.2 ml Natrium-Citrat zugesetzt wurde. Zur Färbung wurde zu 1 ml des mit 0.2 ml Ribonucleaselösung bzw. 0.2 ml Natrium-Citrat versetzten Blutes 0.2 ml der Toluidinblaulösung hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde durch 60 Minuten in ein Wasserbad von 25°C gestellt. Anschließend wurden Blutausstriche hergestellt, die Präparate im Polarisationsmikroskop untersucht und die im Protoplasma der Leukocyten auftretenden doppelbrechenden Strukturen ausgezählt.

Fermentlösung: 10 mg einer kristallisierten Ribonuclease der Firma C.F. B o e h r i n g e r wurde in 100 ml Natrium-Citrat-Lösung von ph 7 gelöst.

Zur Untersuchung inwieweit die im Protoplasma der Leukocyten auftretende Doppelbrechung durch äußere Einwirkungen beeinflußbar ist, setzte ich Blutausstriche, die nach der vorn angegebenen Weise hergestellt wurden, der Einwirkung von Osmiumtetroxyd (Acidum osmicum solut. 2% M e r c k), Wasser, physiologischer Kochsalzlösung und Hitze aus.

a) Versuch der Fixation mit Osmiumtetroxyd :

Auf den Boden einer Petrischale brachte ich einige Tropfen Osmiumtetroxyd auf und lagerte den Objektträger auf zwei Holzstäbchen derart auf, daß der Blutfilm den Dämpfen direkt ausgesetzt war, ohne mit der Flüssigkeit selbst in Berührung zu kommen. Die Petrischale wurde mit einer eingefetteten, geschliffenen Glasplatte luftdicht abgedeckt und der Blutausstrich durch 30 Sekunden den Osmiumdämpfen ausgesetzt. Die derart behandelten Blutausstriche wurden anschließend polarisationsmikroskopisch untersucht.

b) Wassereinwirkung :

Auf den Objektträgerausstrich wurde ein Deckglas aufgebracht und im Polarisationsmikroskop Leukocyten mit starker Doppelbrechung eingestellt. Sodann wurden mittels einer Spritze einige Tropfen Wasser unter das Deckglas gebracht und die

Einwirkung des Wassers auf die doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten beobachtet.

c) Einwirkung von physiologischer Kochsalzlösung :

Versuchsanordnung wie unter b).

d) Hitzefixation :

Die Blutausstriche wurden mit der Ausstrichfläche nach unten mehrmals durch eine Flamme gezogen und anschließend im Polarisationsmikroskop betrachtet.

U n t e r s u c h u n g s e r g e b n i s

1.) Morphologie der doppelbrechenden Strukturen in den Leukocyten des peripheren Blutes nach Supravitalfärbung mit Toluidinblau.

Zum besseren Verständnis der folgenden Ausführungen wird zunächst die Morphologie der doppelbrechenden Strukturen in den Leukocyten des peripheren Blutes am Beispiel der günstigsten Färbbarkeit und Farbstoffkonzentration dargestellt.

Da sich aus den nachgenannten Versuchen ergab, daß bei Zugabe von 0.2 ml Toluidinblau zu 1 ml Blut und einer Färbedauer von einer Stunde die beste Anfärbung erzielt werden kann, führte ich eine genaue Untersuchung der hierbei im Leukocyten auftretenden doppelbrechenden Strukturen durch. Verwandt wurden hierzu jeweils Ausstrichpräparate von Blut welches mit Natrium-Citrat ungerinnbar gemacht wurde.

In diesen Präparaten lassen sich nach Form und Größe sehr deutlich drei gegeneinander abgrenzbare doppelbrechende Strukturen in den granulierten Leukocyten erkennen. Diese sind:

a) <u>Feine, eben noch erkennbare anisotrope Körnchen.</u>

Sie leuchten zwischen gekreuzten Polars gelb bis grünlich auf. Bei Kompensation mit

dem elliptischen Kompensator kann an ihnen weder im positiven noch im negativen Drehsinn ein Farbwechsel festgestellt werden. Diese kleinen doppelbrechenden Partikelchen finden sich meist in großer Anzahl unregelmäßig im Protoplasma der Zellen verteilt. Teilweise liegen sie so dicht, daß sie nur schwer gegeneinander abgegrenzt werden können. Im Hellfeld sind diese Partikelchen nicht zu sehen.

b) Anisotrope Körnchen mittlerer Größe

Diese leuchten zwischen gekreuzten Polars ebenfalls gelb bis grünlich auf. Ein Polarisationskreuz kann mit der zur Verfügung stehenden Optik (Ölimmersion 90 : 1, Objektiv 10fach) in ihnen nicht nachgewiesen werden.

Mit dem elliptischen Kompensator kann an diesen doppelbrechenden Körnchen ein Farbumschlag nach rot und grün erzielt werden. Eine Beziehung dieses Farbwechsels zur Lage der Körnchen in den Leukocyten oder zu ihrer Innenstruktur konnte ich nicht feststellen. Die Anordnung dieser doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Zellen ist unregelmäßig. Ich gewann jedoch den Eindruck, daß sie vorwiegend in den Randpartien auftreten.

Im Hellfeld erscheinen diese Strukturen als gut sichtbare blau-schwarz angefärbte Granula. Sie entsprechen in ihrer Größe etwa den Granula der basophilen Leukocyten. Über dem Polarisator bzw. mit dem Analysator allein betrachtet, kann an ihnen kein Dichroismus nachgewiesen werden.

c) Große doppelbrechende Strukturen.

Neben den eben genannten feinen und mittleren doppelbrechenden Strukturen lassen sich in den Leukocyten noch etwa 2 Mikron große doppelbrechende Strukturen nachweisen. Ich bezeichne diese als große doppelbrechende Körnchen. Sie leuchten zwischen gekreuzten Polars relativ hell auf. Ihre Polarisationsfarbe ist weißgelblich. Fast in allen diesen Strukturen kann ein Polarisationskreuz nachgewiesen werden. Bei Kompensation im positiven Drehsinn mit dem elliptischen Kompensator kommt es in den positiven Quadranten dieser Strukturen zu einer deutlich grünen anomalen Polarisationsfarbe, während die negativen Quadranten rötlich erscheinen. Kompensation im negativen Drehsinn führt entsprechend zu einer grünen anomalen Polarisationsfarbe in den negativen Quadranten, während nun die positiven Quadranten rötlich werden.

Im Hellfeld stellen sich diese Strukturen als Ringe dar, welche einen auffallend hellen Mittelpunkt umgeben. Die Farbe der Ringe ist intensiv hellblau bis türkis.

Über dem Polarisator allein betrachtet, läßt sich an den Ringfiguren ein deutlicher Dichroismus nachweisen. Dieser ist rot - türkis. Die rote Farbe tritt jeweils an den Teilen der Ringe auf, die senkrecht zur Schwingungsrichtung des vom Polarisator kommenden Lichts stehen. Türkis erscheinen demgegenüber die parallel zu dieser Bezugsrichtung stehenden Anteile der Ringe. Derartige große doppelbrechende Strukturen fand ich bisher vorwiegend in den äußeren Anteilen des Protoplasmas der Zellen.

2.) Untersuchungen über den Einfluß wechselnder Farbstoffkonzentration und wechselnder Färbezeit am Ausstrichpräparat.

Hellfeld :

Hierbei zeigte sich, daß bei geringer Farbstoffkonzentration und geringer Färbezeit die Leukozyten blaß erscheinen. Im Blaßbläulich angefärbten Protoplasma erscheinen feinste blaue Granula. Der Kern erscheint rötlich.

Mit steigender Farbstoffkonzentration und Färbedauer treten im bläulich gefärbten Proto-

plasma neben feinen blau gefärbten Granula, blau bis blau-schwarz gefärbte mittelgroße bis große Granula auf. Vor allem die groben blau-schwarzen Granula finden wir im randständigen Protoplasma mehrreihig angeordnet, während ihre Dichte gegen den Kern hin abnimmt, um entlang der Kerngrenzen wieder eine Zunahme zu erfahren. Zwischen randständigem Granulasaum und Kern liegt ein heller, feine und wenig grobe Granula enthaltender Bezirk. - In solchen Zellen findet man bisweilen grobe Granula, die sich in dem genannten hellen Feld nahe aneinander gelegt haben und einen ringförmigen etwa 2 Mikron großen Bezirk vom übrigen Protoplasma abgrenzen. Dieser von groben Granula umgebene Teil des Protoplasma erscheint heller gefärbt als das ihn umgebende Protoplasma.

Zwischen gekreuzten Nicols:

Bei geringer Farbstoffkonzentration und geringer Färbezeit ist an den Leukocyten keine oder nur eine feine punktförmige Doppelbrechung nachweisbar.

Mit steigender Farbstoffkonzentration und Färbedauer finden wir eine ständige Zunahme der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der weissen Blutkörperchen, wobei man feine Körnchen, Körnchen mittlerer Größe und große Körnchen unterscheiden kann.

Über dem Polarisator betrachtet, fand ich im Bereich der groben doppelbrechenden Strukturen den vorne beschriebenen von groben blauschwarzen Granula umgebenen Plasmabezirk, dessen Begrenzung rot-türkis aufleuchtet. Wie bereits erwähnt, tritt die rote Farbe jeweils an den Teilen des Ringes auf, die senkrecht zur Schwingungsrichtung des vom Polarisator kommenden Lichtes stehen. Türkis erscheinen die parallel zu dieser Bezugsrichtung stehenden Anteile des Ringes.

Bei Verwendung hoher Farbstoffkonzentrationen (0.8, 1,6 ml Toluidinblaulösung auf 4 ml Blut) und Färbezeiten von 1 - 3 Stunden wird die Doppelbrechung ausgesprochen stark, doch findet sich gleichzeitig neben einer Überfärbung der Leukocyten auch eine vermehrte Schädigung der weißen Blutkörperchen. Diese zeigt sich in einer Volumenzunahme der Zellen. Der Zelleib ist abgerundet, doch finden sich zum größeren Teil Zellen, deren Protoplasma halbkugelförmige Ausstülpungen oder fingerförmige Ausläufer zeigt. Das Protoplasma ist dunkel granuliert. Mit zunehmender Färbezeit ordnen sich die Granula perlschnurartig in mehreren Reihen im randständigen Protoplasma an, so daß zwischen ihnen und dem Kern ein helles, nur wenig Granula enthaltendes Feld erscheint. Die Kernsegmente quellen auf und rücken dabei aneinander. Im Kern selbst lassen sich dunkler und heller gefärbte Bezirke

unterscheiden. Die Kernfärbung nimmt ständig an Intensität zu. Nach etwa 1½ bis 2 Stunden finden wir an den Leukocyten folgende Veränderungen:

Hellfeld:

a) Das Protoplasma ist hell und nur wenig granuliert. Die Granula sind gleichmäßig über das gesamte Protoplasma verteilt, fein und haben an Farbintensität verloren. Der Kern ist blasig aufgetrieben und nur schwer gegen das ihn umgebende Protoplasma abzugrenzen. Seine Farbe ist blaß rötlich-blau. Die Kernsubstanz scheint in das Protoplasma ausgetreten und umgibt den Kernschatten als verwaschener rötlich-blauer Saum.

b) Das Protoplasma ist gequollen, blaßbläulich wenig und fein granuliert. Nur bisweilen findet man einen stark dunkelblau angefärbten randständigen Granulasaum. Die Kernsegmente sind miteinander verklumpt, der Kern ist als unregelmäßig begrenztes, stärkstens dunkelblau gefärbtes Gebilde im Zentrum der Zelle zu erkennen.

c) Ein kleiner Teil der Leukocyten ist nur noch als fein granuliertes Protoplasmaklümpchen vorhanden.

Zwischen gekreuzten Nicols:

ad a) Derart veränderte Zellen zeigen entweder überhaupt keine Doppelbrechung mehr oder nur feinste punktförmig aufleuchtende doppelbrechende Strukturen. In manchen dieser Leukocyten findet sich aber auch eine intensiv grüne Doppelbrechung über dem ganzen blasig aufgetriebenen Kern.

ad b) Diese Leukocyten zeigen höchstens eine feine punktförmige Doppelbrechung im Protoplasma.

ad c) In den Protoplasmaklümpchen ist keine Doppelbrechung mehr nachweisbar.

In Abb. 1 ist das zahlenmäßige Verhältnis von geschädigten und ungeschädigten Leukocyten bei verschieden langer Färbedauer dargestellt. - Ich bin dabei so vorgegangen, daß ich zu 4 ml frisch aus einer Vene entnommenen Blutes, das ich durch Zusatz von 1 ml Natrium-Citrat ungerinnbar gemacht hatte, 1 ml meiner Toluidinblaulösung hinzufügte und nach Färbezeiten von 20; 30; 60; 90; 120 und 150 Minuten Blutausstriche herstellte. Es wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt und der Anteil der geschädigten und nicht geschädigten segmentkernigen Leukocyten sowie der Lymphocyten in Prozent in der vorliegenden Kurve eingetragen.

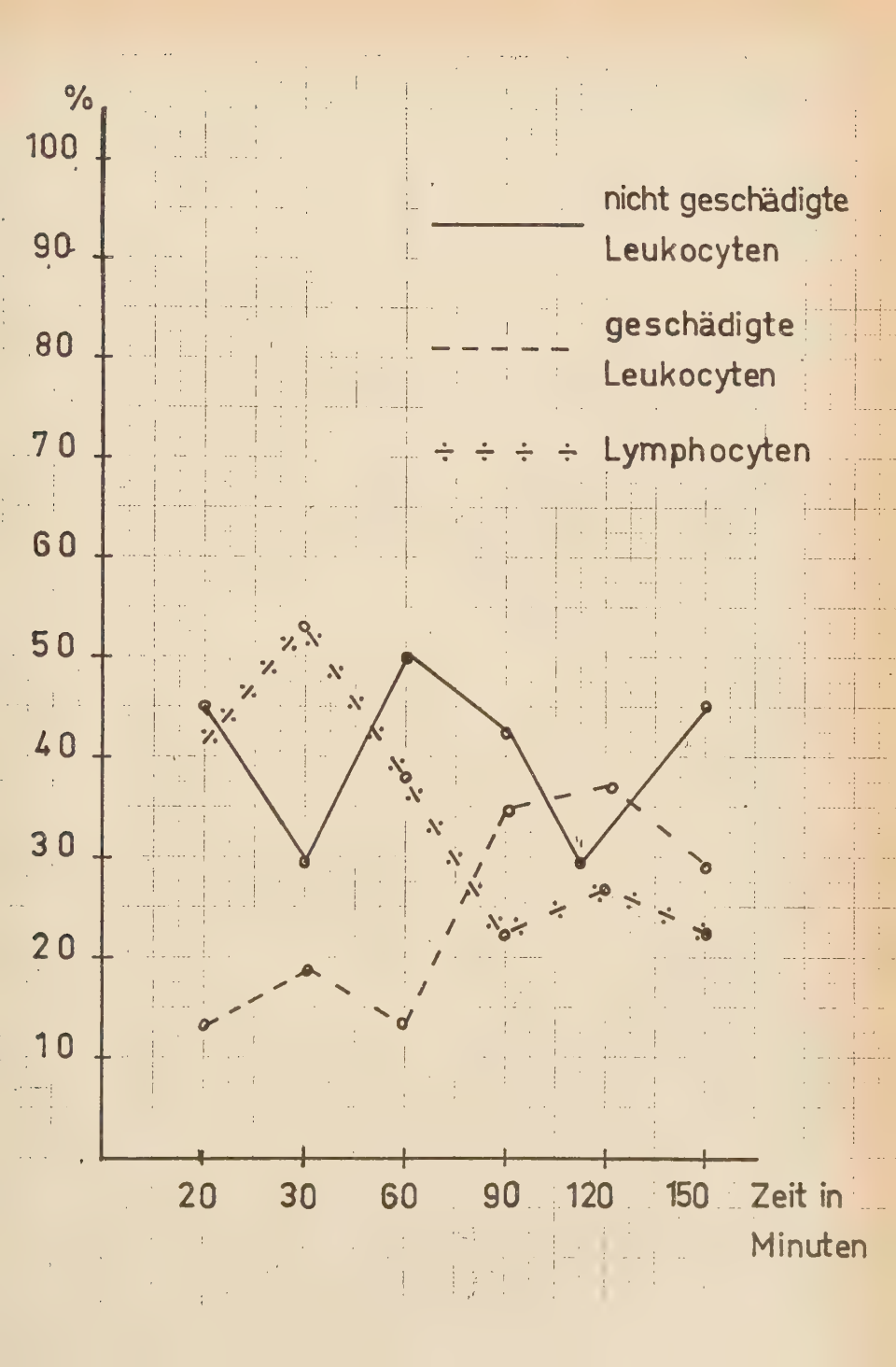

%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
nicht geschädigte Leukocyten
geschädigte Leukocyten
Lymphocyten
20
30
60
90
120
150
Zeit in Minuten

Abb. 1 Darstellung des prozentualen Verhältnisses der nicht geschädigten und geschädigten segmentkernigen Leukocyten sowie der Lymphocyten unter der Einwirkung von Toluidinblau (1 ml Farbstofflösung auf 4 ml Blut) während einer Zeit von 150 Minuten.

Die Kurve zeigt deutlich, daß bei Einwirkung von Toluidinblau über eine Stunde die Zahl der geschädigten Granulocyten einen sprunghaften Anstieg erfährt, der sein Maximum bei zwei Stunden Färbedauer erreicht.

Das Absinken der Zellschädigung nach zweistündiger Farbstoffeinwirkung kann wohl dadurch erklärt werden, daß nicht alle Leukocyten gleiche Empfindlichkeit gegen Toluidinblau zeigen, so daß nach Zerfall des ersten Schubes nach 2 - 2½ Stunden sich nun wieder vorwiegend unveränderte Zellen finden.

Bei Färbezeiten über 3 Stunden kommt es neben der erwähnten vermehrt auftretenden Schädigung der Zellen zu einer Abnahme der doppelbrechenden Substanzen im Protoplasma der Leukocyten.

Ferner wurde festgestellt, daß in dem mit Natrium-Citrat ungerinnbar gemachten Blut eine intensivere und deutlicher sichtbare Doppelbrechung im Gegensatz zu dem mit Heparin versetzten Blut erzielt wird. Die weiteren Versuche wurden daher mit Citratblut durchgeführt.

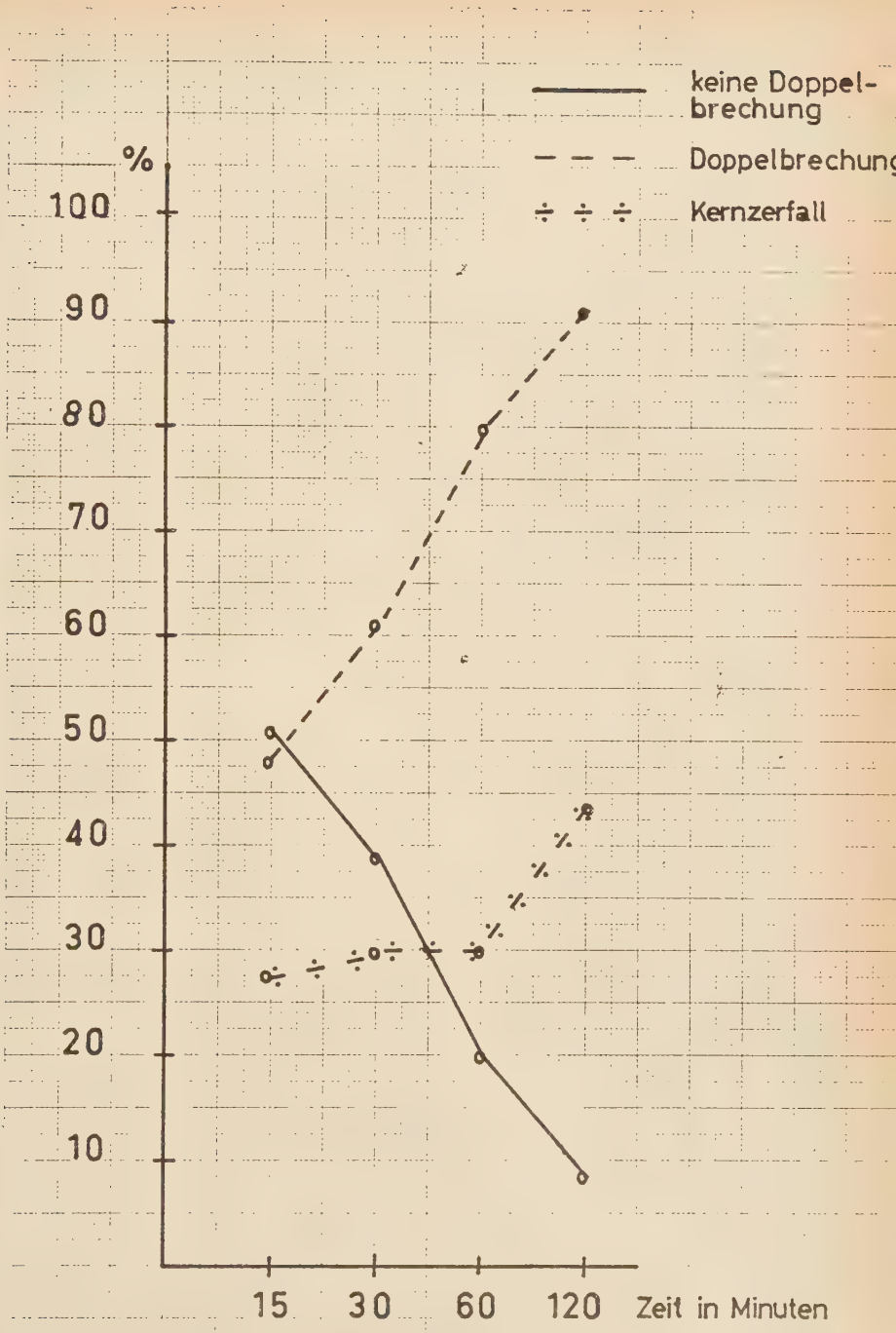
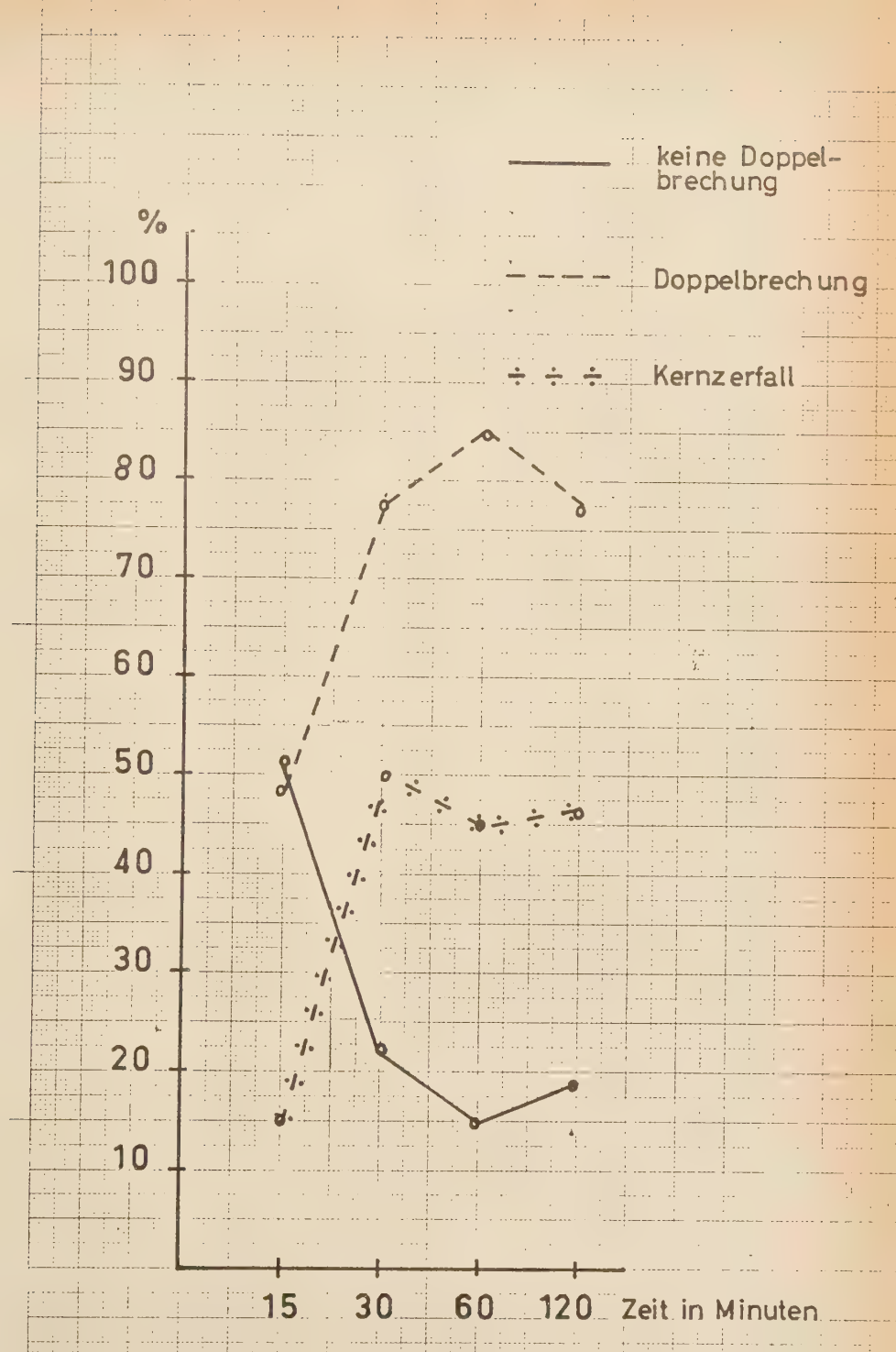

keine Doppel-
brechung
Doppelbrechung
Kernzerfall
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
15
30
60
120
Zeit in Minuten

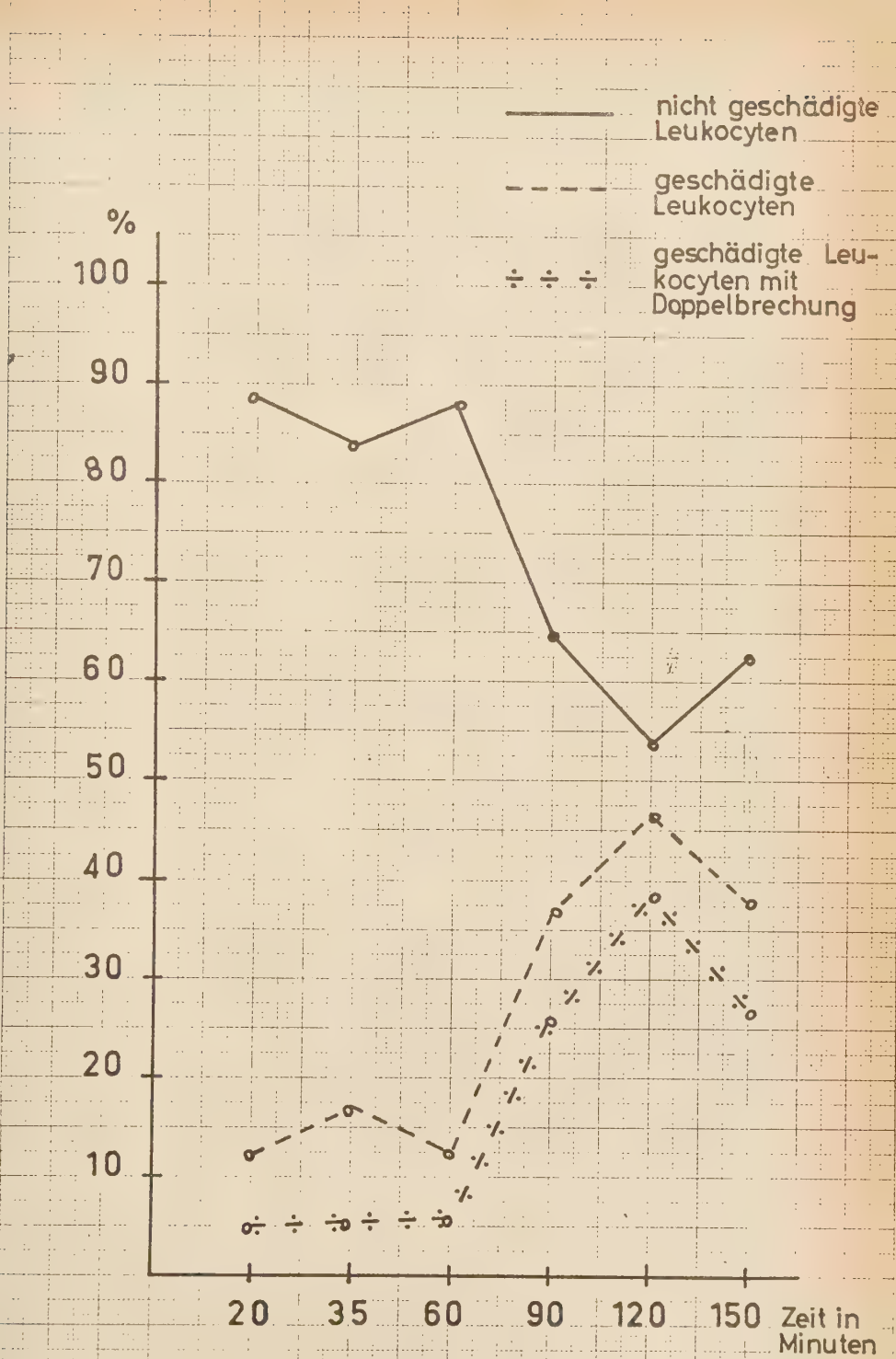
Abb. 2 Darstellung des prozentualen Verhältnisses der Leukocyten, die in ihrem Protoplasma doppelbrechende Strukturen aufweisen, der Leukocyten, in denen noch keine Doppelbrechung nachweisbar ist und der unter der Farbstoffeinwirkung zerfallenen Zellen, bei Zusatz von 0.2 ml Toluidinblau zu 1 ml Blut und Färbezeiten von 15; 30; 60 und 120 Minuten.

Abb. 3 Darstellung des prozentualen Verhältnisses der Leukocyten, die in ihrem Protoplasma doppelbrechende Strukturen aufweisen, der Leukocyten, in denen noch keine Doppelbrechung nachweisbar ist und der unter der Farbstoffeinwirkung zerfallenen Zellen bei Zusatz von 0.4 ml Toluidinblau zu 1 ml Blut und Färbezeiten von 15; 30; 60 und 120 Minuten.


keine Doppelbrechung
Doppelbrechung
Kernzerfall
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
15
30
60
120
Zeit in Minuten

Die beiden Kurven Abb. 1 und Abb. 2 zeigen deutlich die rasch ansteigende Zahl jener Granulocyten, die in ihrem Protoplasma doppelbrechende Strukturen aufweisen, aber auch den gesteigerten Kernzerfall bei Verwendung steigender Farbstoffkonzentrationen und Färbezeiten.

Abb. 4 Darstellung des prozentualen Verhältnisses der nicht geschädigten Leukocyten, der geschädigten Leukocyten ohne doppelbrechende Strukturen und der geschädigten Leukocyten mit Doppelbrechung zueinander bei Verwendung von 0.2 ml Toluidinblau und steigender Färbedauer.


nicht geschädigte Leukocyten
geschädigte Leukocyten
geschädigte Leukocyten mit Doppelbrechung
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
20
35
60
90
120
150
Zeit in Minuten

Betrachtet man die Kurve der Gesamtzahl der geschädigten Zellen und vergleicht mit der Kurve für die geschädigten Leukocyten, welche eine Doppelbrechung zeigen, so finden wir einen parallelen Verlauf der beiden Kurven. Mit Ansteigen der Zahl der geschädigten Leukocyten erfolgt auch ein Anstieg der weissen Blutkörperchen, die eine erkennbare Doppelbrechung aufzuweisen haben.

3.) Untersuchungen über den Färbevorgang in der Kammer.

Die hierzu verwandten Präparate wurden in der vorne angegebenen Weise hergestellt. - Ich machte dabei folgende Beobachtungen :

a) Hellfeld:

Zeit nach Beginn der Färbung :

7-10 Minuten
Die Kerne sind deutlich angefärbt und erscheinen blau. Struktur und Form der Kerne lassen sich genau erkennen. das Protoplasma erscheint leicht bläulich. Doppelbrechende Strukturen können im Protoplasma noch nicht nachgewiesen werden.

30-50 Minuten

Die Intensität der Kernfärbung hat noch etwas zugenommen. Im Protoplasma treten deutlich blau-schwarz gefärbte Granula auf. Zum Teil lebhafte Bewegung der Granula nachweisbar.

50-60 Minuten

Die Kernfärbung bleibt unverändert bestehen. Im Protoplasma werden die blauschwarz gefärbten Granula deutlich sichtbar, welche sich perlschnurartig entlang dem randständigen Protoplasma aufreihen. An manchen Zellen gewinnt man den Eindruck, als ob der Zelleib geringfügig an Volumen zunehme.

70-90 Minuten

Die Verklumpung der Zellkerne nimmt in dieser Zeit zu. An anderen Zellkernen gewinnt man den Eindruck, daß die einzelnen Segmente der Granulocyten aneinander rükken, gleichzeitig kommt es aber auch zu einer Quellung derselben. Mit zunehmender Quellung verliert die Kernsubstanz ihre intensiv blaue Farbe, bis sie schließlich nur noch blaßblau erscheint und zuletzt kaum noch sichtbar ist.

Jene granulierten Leukocyten, an denen eine Verklumpung des Kernes eintritt, behalten ihre bis dahin entstandene Kernstruktur bei.

Das Protoplasma der Zellen wird während dieser Zeit zunehmend blasser. Die nach 60 Minuten noch gut sichtbaren Granula verschwinden dabei.

120-150 Minuten

Die granulierten Leukocyten sind nun nur noch als schwach bläuliche Gebilde erkennbar. Die Kerne sind zum Teil nicht mehr abzugrenzen, zum Teil erscheinen sie als unscharf begrenzter Fleck in rötlicher Farbe innerhalb der Zellen.

Gleichzeitig mit den segmentkörnigen Leukocyten betrachtete ich in der feuchten Kammer die Lymphocyten. Bei ihnen kommt es ebenfalls in den ersten 60 Minuten zu einer deutlichen Anfärbung des Kernes und des Protoplasmas. Teilweise hat man den Eindruck, als ob im Protoplasma feine Granula vorhanden wären. Nach 90 Minuten kommt es auch hier zu einem Nachlassen der Färbung sowohl im Kern als auch im Protoplasma.

An basophilen Leukocyten tritt bereits innerhalb der ersten 10 Minuten eine deutliche Blaufärbung der Granula auf. Der Kern und das übrige Protoplasma verhalten sich innerhalb der ersten Stunden ebenso wie die entsprechenden Strukturen der übrigen Leukocyten. Nach einer Stunde wird die Kernfärbung etwas blasser, es kommt jedoch nicht zum völligen Verschwinden des

Kernes. Ebenso bleiben bei diesen Zellen bis zu 6 Stunden die Granula und das Protoplasma unverändert erhalten.

Die eben beschriebenen Veränderungen der von mir beobachteten Zellen in der feuchten Kammer sind in ihrer zeitlichen Reihenfolge bei Zugabe von 0.1 und 0.2 ml meiner Toluidinblaulösung unabhängig von der angewandten Farbstoffkonzentration. Bei Zugabe von 0.4 ml Farbstoff und mehr zu 1 ml Blut, tritt bereits innerhalb der ersten 30 Minuten so intensive Färbung der Zellen auf, daß eine genaue Beobachtung nicht mehr möglich war. Ich gewann aber den Eindruck, daß auch hier nach einer Stunde der Zerfall einzelner Zellen beginnt.

In der folgenden Kurve (Abb. 5) habe ich das Verhältnis der zugrunde gehenden Zellen zu jenen, deren Struktur erhalten bleibt, dargestellt. Hier läßt sich besonders leicht erkennen, daß der Zelluntergang nach 60 Minuten beginnt und dann rasch fortschreitet.

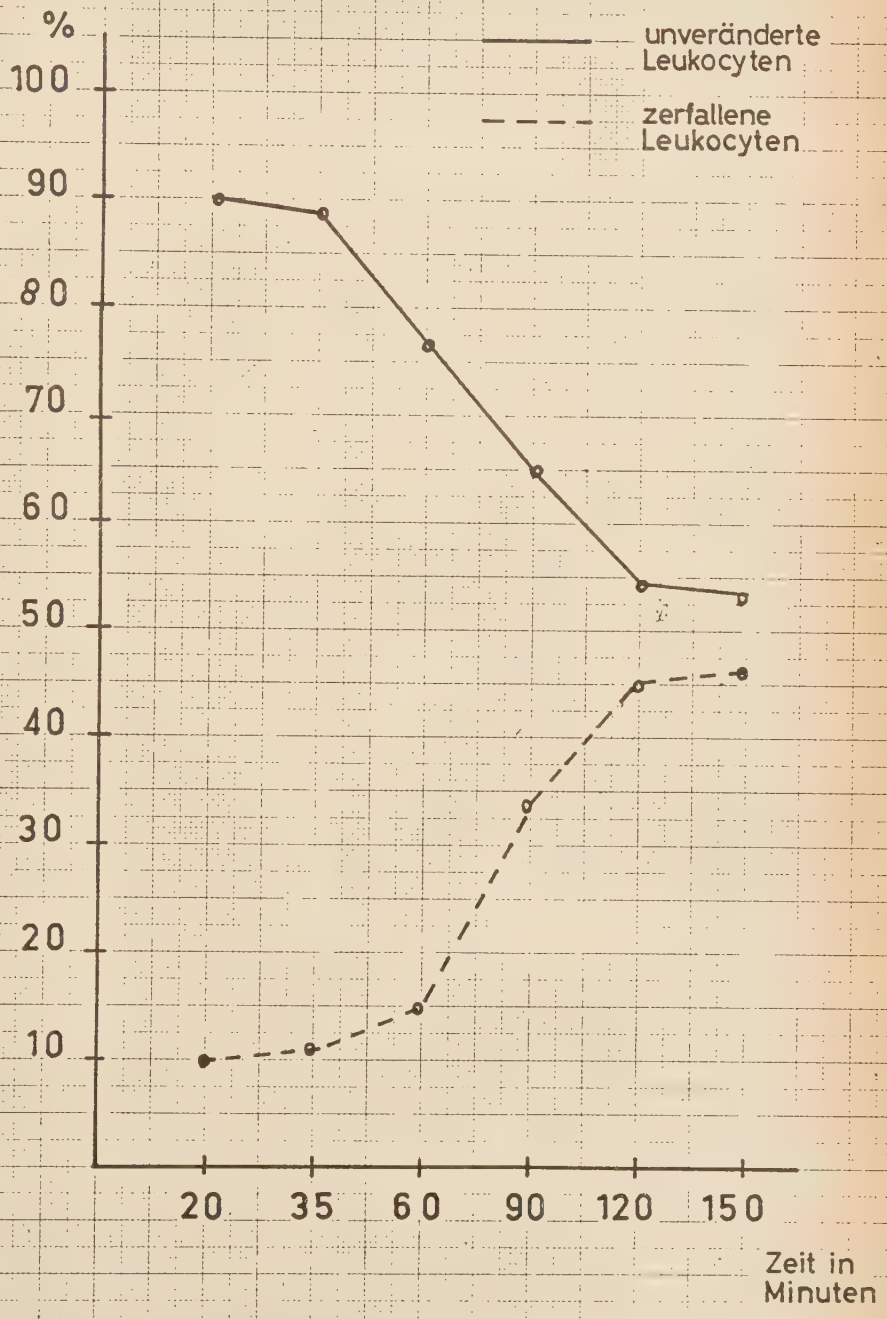

%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
unveränderte Leukocyten
zerfallene Leukocyten
20
35
60
90
120
150
Zeit in Minuten

Abb. 5 Darstellung des prozentualen Verhältnisses der unveränderten Leukocyten und zerfallenen Leukocyten unter der Einwirkung von Toluidinblau (1 ml Farbstofflösung auf 4 ml Blut) während einer Zeit von 150 Minuten Beobachtung in der feuchten Kammer.

b) Zwischen gekreuzten Nicols

Zeit nach Beginn der Färbung :

7-10 Minuten

In dieser Zeit läßt sich zwischen gekreuzten Polars noch keine Doppelbrechung erkennen mit Ausnahme vereinzelter kleiner anisotroper Punkte in den granulierten Leukocyten, ausgenommen die basophilen Zellen. An den letzteren tritt bereits nach dieser kurzen Färbedauer eine intensive Doppelbrechung der Granula auf.

20-50 Minuten

Nach 20 Minuten beginnt in fast allen Zellen eine eben sichtbare Doppelbrechung aufzutreten. Zunächst lassen sich dabei nur feinste Körnchen erkennen. Etwas später treten dann auch die vorne beschriebenen mittleren und größeren anisotropen Strukturen auf.

50-60 Minuten

Bei dieser Zeit nimmt die Doppelbrechung in ihrer Stärke noch etwas zu und ist nach einer Stunde deutlich zu sehen.

60-90 Minuten

Während dieser Zeit beginnt bereits eine geringfügige Abnahme der Doppelbrechung, so daß die einzelnen anisotropen Strukturen nicht mehr so hell aufleuchten.

90-150 Minuten

Die körnchenförmige Doppelbrechung im Protoplasma der Zellen verschwindet entsprechend den im Hellfeld sichtbaren Granula.

Auffallend ist nun, daß an einem Teil der Zellkerne und zwar gerade bei jenen, welche im Hellfeld zu dieser Zeit eine rötliche Färbung annehmen, eine gelbliche Doppelbrechung auftritt.

Daneben findet man granulierte Leukocyten, die während der ganzen Beobachtungsdauer überhaupt keine Doppelbrechnung zeigen.

Lymphocyten zeigen manchmal in ihrem Proto-Plasmasaum doppelbrechende Pünktchen.

Ebenso weisen Monocyten nur eine schwache punktförmige Doppelbrechung auf.

4.) Morphologie der doppelbrechenden Granula in den verschiedenartigen Leukocyten.

Hellfeld :

a) Segmentkernige Leukocyten :

Im blaßbläulich angefärbten Protoplasma der segmentkernigen Leukocyten findet man feine bis grobe blau bis schwarz gefärbte Granula. Vorwiegend im randständigen Protoplasma ordnen sich die groben blau-schwarz gefärbten Granula

mehrreihig an.Zwischen diesem Granulasaum und dem blau-rot gefärbten Kern,dessen Segmente nur wenig gequollen erscheinen,befindet sich ein helles, fein granuliertes Feld, in dem vereinzelt auch grobe Granula auftreten. Hier finden wir in manchen Leukocyten grobe Granula ringförmig um einen hellbläulichen Bezirk angeordnet. - Dem Kern angelagert finden sich wieder grobe Granula.

b) Lymphocyten :

Diese zeigen keinerlei Abweichungen von dem gewohnten Bild, das sie bei einer Färbung nach P a p p e n h e i m zeigen.Ihre Farbe ist intensiv dunkelblau. In ihrem Plasmasaum finden sich bisweilen 1-3 grobe Granula.

c) Monocyten :

Im dunkelblau gefärbten Protoplasma finden sich zahlreiche dicht gelagerte mittelgroße bis grobe blau-schwarze Granula. Der große Kern ist intensiv rötlich-blau gefärbte und erscheint homogen.

d) Eosinophile Leukocyten :

Im bläulichen Protoplasma finden wir mittelgroße rötlich-blaue Granula,daneben in großer Anzahl grobe dunkelblaue bis schwarze Granula. Der Kern erscheint homogen und rötlich-blau.

e) Basophile Leukocyten :

Der rötlich-blau gefärbte große Kern ist von den dicht aneinandergelagerten groben blau-schwarzen basophilen Granula umgeben,welche das Protoplasma vollkommen ausfüllen.

Zwischen gekreuzten Nicols :

ad a) In den segmentkernigen Leukocyten treten fein doppelbrechende Strukturen im Bereich des ganzen Protoplasma auf, darunter, weniger zahlreich, doppelbrechende Strukturen mittlerer Größe. Im Bereich der vorne besprochenen ringförmigen, von groben blau-schwarzen Granula umgebenen Plasmabezirke, finden sich grobe doppelbrechende Körnchen mit Polarisationskreuz.

ad b) Die Lymphocyten weisen im allgemeinen keine doppelbrechenden Strukturen auf. Bisweilen findet man Lymphocyten, die in ihrem Plasmasaum feine oder - selten - grobe doppelbrechende Strukturen zeigen. Doppelbrechende Körnchen mittlerer Größe fand ich bei ihnen nie.

ad c) Im Protoplasma der Monocyten tritt nur spärlich eine feine Doppelbrechung auf. Ganz vereinzelt finden wir Zellen mit einem groben doppelbrechenden Körnchen.

ad d) In den eosinophilen Leukocyten fand ich doppelbrechende Strukturen aller drei Größenordnungen jedoch sehr spärlich, wobei die feinen, doppelbrechenden Strukturen überwiegen.

ad e) Die basophilen Leukocyten zeigen gegenüber den bisher beschriebenen Strukturen ein eigenes Verhalten. Hier leuchten zwischen gekreuzten Polars die Granula der Zellen in wechselnden Farben rot, gelb und grün auf. Ein Polarisationskreuz läßt sich in ihnen nur ganz vereinzelt erkennen.

An den Zellkernen sämtlicher weißer Blutkörperchen ließ sich keine Doppelbrechung nachweisen mit Ausnahme von gequetschten Kernen, welche zwischen gekreuzten Polars eine intensiv grüne Doppelbrechung erkennen lassen.

5.) Auszählung der doppelbrechenden Strukturen an supravital mit Toluidinblau gefärbten granulierten Leukocyten.

In dieser Versuchsreihe wurden von je 20 männlichen und weiblichen gesunden Probanden in der vorne angegebenen Weise Ausstriche hergestellt. Ich teilte dabei die im einzelnen granulierten Leukocyten auftretenden anisotropen Strukturen in der folgenden Weise ein :

a) Keine erkennbare Doppelbrechung (k)

Hierunter sind sämtliche Zellen erfaßt, bei denen zwischen gekreuzten Polars keine Doppelbrechung festgestellt werden konnte.

b) Feinkörnige Doppelbrechung (f)

Hiermit bezeichne ich jene granulierten Leukocyten, bei denen im Protoplasma eben sichtbare kleine doppelbrechende Punkte nachzuweisen sind.

c) Feinkörnige Doppelbrechung zusammen mit 1-3 doppelbrechende Körnchen mittlerer Größe (f + 1 - 3 m) :

Hierunter sind sämtliche granulierten Leukocyten erfaßt, bei denen neben einer eben sichtbaren Doppelbrechung 1 - 3 der vorne beschriebenen doppelbrechenden Körnchen mittlerer Größe sichtbar sind.

d) Feinkörnige Doppelbrechung zusammen mit mehr als drei doppelbrechenden Körnchen mittlerer Größe (f + > 3 m)

Die hier aufgeführten granulierten Leukocyten haben neben der eben sichtbaren feinen Doppelbrechung mehr als drei anisotrope Körnchen mittlerer Größe, jedoch nicht mehr als 10.

e) Feinkörnige Doppelbrechung und zahlreiche doppelbrechende Körnchen mittlerer Größe (f + m +++) :

Bei den hier aufgeführten granulierten Leukocyten überwiegen bei weitem die anisotropen doppelbrechenden Körnchen mittlerer Größe, doch läßt sich die feinkörnige Doppelbrechung zwischen diesen eben noch erkennen. In der Regel ist dabei das Protoplasma

völlig mit mittelgroßen doppelbrechenden Körnchen angefüllt.

f) Feinkörnige Doppelbrechung und 1 - 3 große doppelbrechende Körnchen (f + g 1 - 3):

Die hier angeführten granulierten Leukocyten zeichnen sich durch das Auftreten von 1 - 3 der vorne beschriebenen, im Hellfeld als Ringfiguren erscheinenden großen doppelbrechenden Partikelchen aus, neben einer feinen im Protoplasma verteilten Doppelbrechung.

g) Feinkörnige Doppelbrechung zusammen mit 4-10 großen doppelbrechenden Körnchen (f + g 4 - 10) :

Diese granulierten Leukocyten entsprechen den unter der vorigen Nummer genannten, jedoch lassen sich in ihnen 4 - 10 der großen doppelbrechenden Teilchen nachweisen.

h) Feinkörnige Doppelbrechung und mehr als 10 große doppelbrechende Körnchen (f + g > 10) :

Hierunter verstehen wir alle jene granulierten Leukocyten, bei denen neben einer feinen Doppelbrechung mehr als 10 anisotrope Körnchen mit Polarisationskreuz nachweisbar sind.

i) Lymphocyten :

Wie vorne beschrieben, lassen die Lymphocyten in der Regel keine Doppelbrechung erkennen. Sie sind daher nicht weiter unterteilt.

Bei jeder Zählung wurden zunächst 200 weiße Blutzellen ausgezählt. Im Anschluß daran wurde die Anzahl der bis dahin ausgezählten granulierten Leukocyten auf 100 aufgefüllt. Die Ergebnisse dieser Differenzierung der Doppelbrechung in den granulierten Leukocyten sind in den folgenden Tabellen in Prozent dargestellt. Dabei ist jeweils die prozentuale Verteilung aller Zellen als a bezeichnet und jene der granulierten Leukocyten als b.

P R O B A N D Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	I		II		III		IV		V	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
f	48	71	48	66	34	65	26	32	29	44
f+1-3 m	7	10	7	13	6	7	11	16	12	15
f+ > 3 m	-	-	-	-	-	1	8	9	6	6
f+ m+++	-	-	-	-	-	-	1	-	2	2
f+g 1-3	15	19	13	19	15	19	21	26	17	27
f+g 4-10	-	-	2	2	2	8	11	13	4	6
f+g > 10	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-
Lymphocyten	30	-	30	-	43	-	18	-	30	-

PROBAND Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	VI		VII		VIII		IX		X	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
f	44	58	39	53	40	69	38	58	45	67
f + 1 – 3 m	15	19	9	18	8	17	7	11	11	13
f + > 3 m	2	2	1	1	–	–	–	–	–	4
f + m+++	1	1	–	–	1	1	–	–	2	2
f + g 1–3	12	18	18	22	6	12	14	28	12	16
f + g 4–10	1	2	3	6	1	1	1	3	2	2
f + g >10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Lymphocyten	26	–	30	–	44	–	40	–	28	–

PROBAND Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	XI		XII		XIII		XIV		XV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
f	42	57	26	47	40	57	51	60	36	47
f + 1-3 m	9	16	12	15	17	22	14	19	17	25
f + > 3 m	5	6	2	4	2	3	2	2	2	2
f + m+++	1	1	-	-	1	2	-	-	-	-
f + g 1-3	10	19	19	29	9	14	13	18	14	22
f + g 4-10	1	1	3	4	2	2	1	1	1	4
f + g > 10	-	--	-	1	-	---	-	-	-	-
Lymphocyten	32	-	38	-	29	-	19	-	30	-

P R O B A N D Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	XVI a	XVI b	XVII a	XVII b	XVIII a	XVIII b	XIX a	XIX b	XX a	XX b
f	35	50	41	56	27	40	54	70	34	56
f + 1-3 m	15	17	11	16	13	18	4	6	9	16
f + > 3 m	3	3	1	1	4	8	1	2	1	3
f + m+++	2	3	1	1	-	-	1	1	2	3
f + g 1-3	11	21	16	22	20	31	15	17	8	14
f + g 4-10	3	5	2	4	1	2	4	4	5	7
f + g > 10	-	1	-	-	1	1	-	-	1	-
Lymphocyten	31	-	28	-	34	-	21	-	40	-

PROBAND Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	I		II		III		IV		V	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
f	21	40	43	66	35	80	40	47	35	47
f + 1-3 m	23	28	10	16	7	12	22	30	26	33
f + > 3 m	3	6	2	2	-	1	6	10	3	4
f + m+++	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-
f + g 1-3	17	25	9	13	4	7	7	13	12	16
f + g 4-10	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
f + g > 10	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
Lymphocyten	35	-	33	-	54	-	25	-	24	-

P R O B A N D Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	VI		VII		VIII		IX		X	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
f	39	49	43	56	38	52	42	58	39	58
f + 1-3 m	24	27	16	22	14	26	16	27	11	20
f + > 3 m	2	2	2	2	6	6	-	-	-	1
f + m+++	1	1	-	-	2	3	1	1	1	-
f + g 1-3	17	18	14	17	8	13	9	14	10	19
f + g 4-10	3	3	2	3	-	-	-	-	2	2
f + g > 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocyten	14	-	23	-	32	-	32	-	37	-

P R O B A N D Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	XI		XII		XIII		XIV		XV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
f	29	43	44	53	39	54	47	58	46	86
f + 1–3 m	25	33	17	23	14	19	20	27	6	7
f + > 3 m	5	6	6	10	8	8	1	2	–	–
f + m+++	2	2	1	1	–	–	1	1	–	–
f + g 1–3	11	16	8	11	14	19	9	10	1	4
f + g 4–10	–	–	2	2	–	–	2	2	1	3
f + g > 10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Lymphocyten	28	–	23	–	24	–	20	–	46	–

P R O B A N D Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	XVI a	XVI b	XVII a	XVII b	XVIII a	XVIII b	XIX a	XIX b	XX a	XX b
f	70	85	56	79	50	85	41	79	40	68
f + 1-3 m	5	7	8	10	6	11	7	12	4	9
f + > 3 m	1	1	-	-	-	1	-	1	-	1
f + m+++	2	4	1	2	-	2	-	-	1	1
f + g 1-3	2	3	7	8	1	2	3	8	12	15
f + g 4-10	-	-	-	1	-	-	-	-	4	6
f + g > 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocyten	20	-	28	-	43	-	49	-	39	-

M I T T E L W E R T E IN %

Art der Doppelbrechung	männlich a	männlich b	weiblich a	weiblich b
f	38,85%	56.1 %	41.85%	61.4 %
f + 1-3 m	10.5 %	15.45%	14.55%	20.3 %
f + > 3 m	2.0 %	2.75%	2.25%	3.3 %
f + m+++	0.75%	0.85%	0.75%	1.05%
f + g 1-3	13.6 %	20.65%	8.8 %	12.9 %
f + g 4-10	2.5 %	3.85%	0.75%	1.0 %
f + g > 10	0.25%	0.35%	0.05%	0.05%
Lymphocyten	32.0 %	-.-	31.0 %	-.-

Zur Feststellung, wie weit sich hierbei reproduzierbare Werte erhalten lassen, habe ich von dem bei einer Entnahme gewonnenen Blut 10 Zählungen durchgeführt. Sie sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Art der Doppelbrechung	ZÄHLUNG Nr. I		II		III		IV		V	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
f	49	78	54	79	47	72	52	78	49	79
f + 1-3 m	8	11	6	9	8	13	10	12	11	14
f + > 3 m	1	1	-	1	1	1	-	-	-	-
f + 3+++	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3
f + g 1-3	7	8	5	10	5	12	5	8	2	3
f + g 4-10	1	1	-	-	1	1	-	-	-	1
f + g > 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocyten	33	-	34	-	37	-	31	-	36	-

Art der Doppel-brechung	ZÄHLUNG Nr. VI a	VI b	VII a	VII b	VIII a	VIII b	IX a	IX b	X a	X b
f	42	63	30	47	43	60	29	44	42	66
f + 1-3 m	13	17	18	24	15	18	12	15	10	10
f + > 3 m	2	2	3	5	1	4	6	6	1	1
f + m+++	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2
f + g 1-3	11	14	12	22	8	14	17	27	15	21
f + g 4-10	3	4	1	2	4	4	4	6	-	-
f + g > 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lymphocyten	30	-	36	-	29	-	30	-	30	-

Zur Untersuchung, ob sich an den granulierten Leukocyten bei Krankheiten verschiedener Art Veränderungen an den doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma nachweisen lassen, wurden in der vorne angegebenen Weise Ausstriche hergestellt und nach der angeführten Differenzierungsmethode ausgezählt. Zur Untersuchung verwandte ich Blut von Patienten, die an

Filariasis
Bronchopneumonie
Morbus Pfeifer
Koma diabeticum
Dickdarmcarcinom
Perforierter Appendicitis
Chronischer Hepatitis

erkrankt waren.

Ich konnte im Blut dieser Patienten einen Anstieg vor allem der feinkörnigen Doppelbrechung im Protoplasma der granulierten Leukocyten, sowie eine Zunahme der doppelbrechenden Körnchen mittlerer Größe feststellen.

Bei einem Fall einer perforierten Appendicitis hatte ich Gelegenheit, die Doppelbrechung der Leukocyten sofort zu Beginn des Krankheitsbildes, während der ersten Tage nach der akuten Erkrankung und nach der Ausheilung zu zählen. - Es handelte sich hierbei um einen siebenjährigen Knaben, bei dem wenige Stun-

den vor der Aufnahme in die hiesige Chirurgische Klinik akute abdominelle Schmerzen auftraten. Die Operation wurde sofort durchgeführt. Nach 17 Tagen konnte der Junge wieder aus der Klinik entlassen werden. - Die Ergebnisse der Auszählung sind in der Kurve dargestellt.

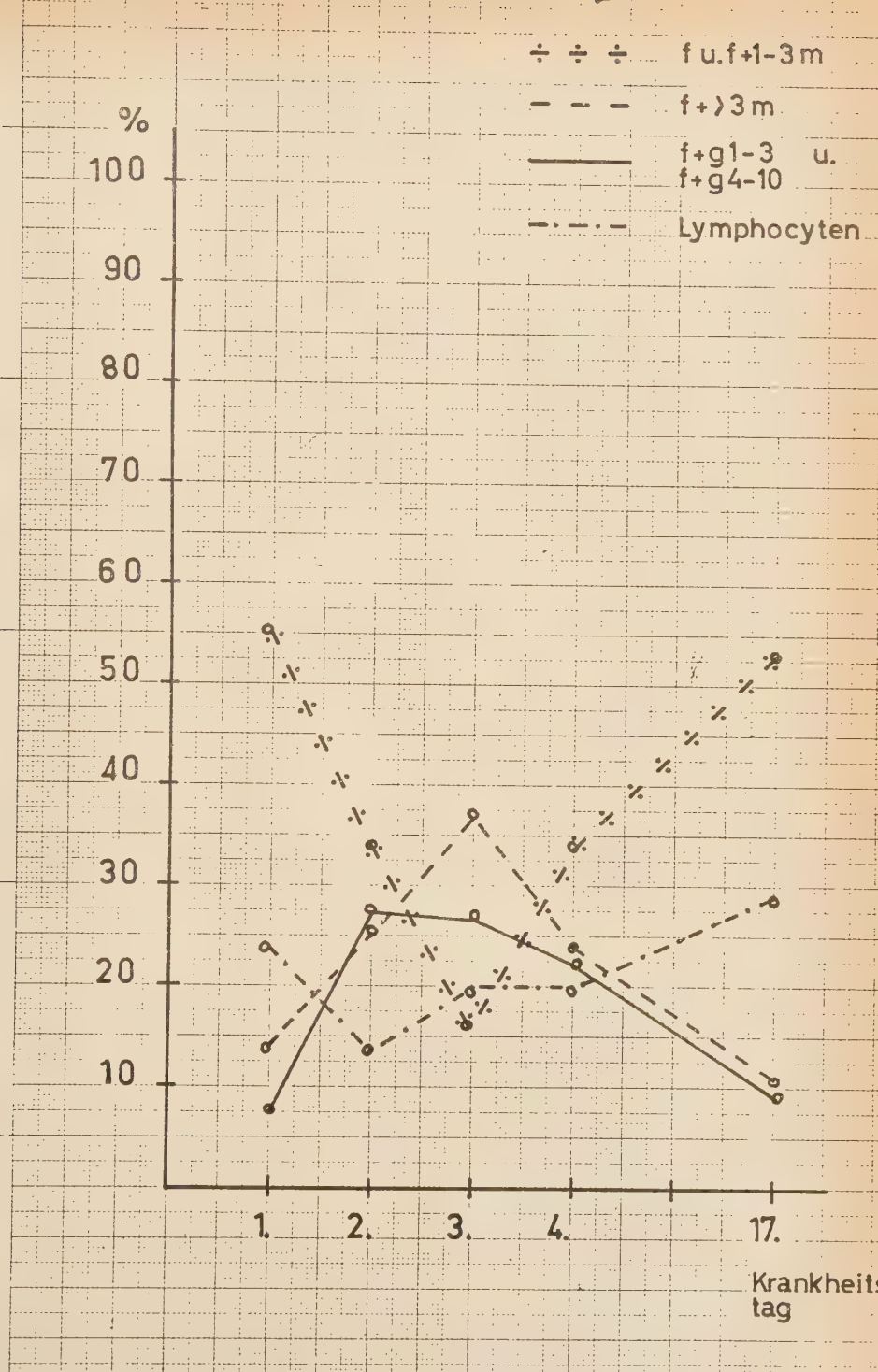

÷ ÷ ÷ f u. f+1-3 m
– – – f+>3 m
——— f+g1-3 u. f+g4-10
–·–·– Lymphocyten
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
1.
2.
3.
4.
17.
Krankheits tag

Abb. 6 Darstellung des prozentualen Verhältnisses der verschiedenartigen doppelbrechenden Strukturen der Leukocyten am Beispiel eines Patienten mit perforierter Appendicitis.

Ich habe in diesem Falle zur übersichtlicheren Darstellung die Werte für f und f + 1 - 3 m, f + g 1 - 3 und f + g 4 - 10 jeweils zusammengezogen und als Kurve wiedergegeben.

Nach dieser Kurve zeigen die als f und f + 1 - 3 m bezeichneten doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der granulierten Leukocyten während des akuten Krankheitsverlaufes ein deutliches Absinken, um am dritten Tag p.Op. rasch wieder anzusteigen. Mit diesem Anstieg der feinkörnigen doppelbrechenden Strukturen findet sich ein Absinken der vorher stark vermehrten grob doppelbrechenden Körnchen im Protoplasma der granulierten Leukocyten.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß die weitgehende Differenzierung der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der granulierten Leukocyten in f, f + 1 - 3 m, f + > 3 m, f + m +++, f + g 1 - 3, f + g 4 - 10 und f + g > 10 aufgegeben und die vorn bereits besprochene Unterteilung in kleine, mittlere und große Körnchen beibehalten werden kann.

Ich nahm nun mit der vereinfachten Unterteilung der doppelbrechenden Strukturen in kleine, mittlere und große Körnchen Auszählungen vor. - Ich stellte, wie oben angegeben, Ausstriche vom Blut 20 gesunder männlicher und weiblicher Probanden her und erhielt dabei die folgenden Werte : a und b entsprechen wieder der prozentualen Verteilung der anisotropen Körnchen aller Zellen bzw. jener der granulierten Leukocyten.

PROBAND Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	I		II		III		IV		V	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
klein	48	71	48	66	34	65	26	32	29	44
mittel	7	10	7	13	6	8	20	25	20	23
groß	15	19	15	21	17	27	35	42	21	33
Lymphocyten	30	-	30	-	43	-	18	-	30	-

PROBAND Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	VI		VII		VIII		IX		X	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
klein	44	58	39	53	40	69	38	58	45	67
mittel	18	22	10	19	9	18	7	11	13	15
groß	13	20	21	28	7	13	15	31	14	18
Lymphocyten	26	-	30	-	44	-	40	-	28	-

PROBAND Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	XI		XII		XIII		XIV		XV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
klein	42	57	26	47	40	57	51	60	36	47
mittel	15	23	14	19	20	27	16	21	19	27
groß	11	20	22	24	11	16	14	19	15	26
Lymphocyten	32	-	38	-	29	-	19	-	30	-

PROBAND Nr.
(männlich)

Art der Doppelbrechung	XVI		XVII		XVIII		XIX		XX	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
klein	35	50	41	56	27	40	54	70	34	56
mittel	20	23	14	18	17	26	6	9	12	22
groß	14	27	18	26	22	34	19	21	14	22
Lymphocyten	31	-	28	-	34	-	21	-	40	-

P R O B A N D Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	I		II		III		IV		V	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
klein	21	40	43	66	35	80	40	47	35	47
mittel	26	34	14	20	7	13	28	40	29	37
groß	18	26	10	14	4	7	7	13	12	16
Lymphocyten	35	-	33	-	54	-	25	-	24	-

PROBAND Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	VI		VII		VIII		IX		X	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
klein	39	49	43	56	38	52	42	58	39	58
mittel	27	30	18	24	22	35	17	28	12	21
groß	20	21	16	20	8	13	9	14	12	21
Lymphocyten	14	-	23	-	32	-	32	-	37	-

PROBAND Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	XI		XII		XIII		XIV		XV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
klein	29	43	44	53	39	53	47	58	46	86
mittel	32	41	24	34	22	27	22	30	6	7
groß	11	16	10	13	14	19	11	12	2	7
Lymphocyten	28	-	23	-	24	-	20	-	46	-

PROBAND Nr.
(weiblich)

Art der Doppelbrechung	XVI a	XVI b	XVII a	XVII b	XVIII a	XVIII b	XIX a	XIX b	XX a	XX b
klein	70	85	56	79	50	85	41	79	40	68
mittel	8	12	9	12	6	14	7	13	5	11
groß	2	3	7	9	1	2	3	8	14	21
Lymphocyten	20	-	28	-	43	-	49	-	39	-

M I T T E L W E R T E I N %

Art der Doppelbrechung	männlich a	männlich b	weiblich a	weiblich b
klein	38.85%	56.1 %	41.85%	61.4 %
mittel	12.80%	19.05%	17.55%	24.65%
groß	16.35%	24.85%	8.88%	13.95%
Lymphocyten	32.0 %	-.-	31.0 %	-.-

Aus den vorliegenden Tabellen ist ersichtlich, daß sich für das Verhältnis der im Protoplasma der granulierten Leukocyten auftretenden doppelbrechenden Strukturen beim gesunden Menschen Normalwerte aufstellen lassen. In den weißen Blutkörperchen aller Probanden fand ich vorwiegend kleine und Körnchen mittlerer Größe. Bei den männlichen Probanden lag die Zahl der granulierten Leukocyten mit groben doppelbrechenden Körnchen höher als bei den weiblichen.

6.) Untersuchungen über den Einfluß von Ribonuclease auf die doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der weißen Blutkörperchen.

In den Ausstrichpräparaten von Blut, welchem ich eine Ribonucleaselösung zugesetzt hatte, schien sich eine Zunahme der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten vorzufinden.

Hellfeld :

a) Neutrophile Leukocyten :

Das blaßblau gefärbte Protoplasma der neutrophilen Leukocyten ist wenig bis stark gequollen. Die Kerne haben sich intensiv rötlichblau angefärbt und sind mit wenigen Ausnahmen kaum gequollen. Das Protoplasma ist stark granuliert mit Überwiegen von groben blauschwarzen Granula, die nicht selten ein großes randständig gelegenes, vakuolenähnliches Gebilde umgeben.

In einigen Blutausstrichen fand ich zahlreiche segmentkernige Leukocyten, deren Kerne bis auf ein feines, blaßbläuliches Restchromatingerüst aufgelöst waren.

b) Lymphocyten :

An diesen fanden sich keinerlei Abweichungen vom gewohnten Bild. Nur bisweilen fand sich auch bei ihnen eine Auflösung des Kernes in ein feines, blaßblau gefärbtes Chromatingerüst, wobei die ganze Zelle stark gequollen war.

c) Monocyten :

An ihnen fanden sich keine, von der Norm abweichende Veränderungen.

d) Eosinophile Leukocyten :

An diesen Zellen fanden sich ebenfalls keine Abweichungen von dem Bild, das sie in Ausstrichpräparaten zeigen, die von Blut, welches mit Natrium-Citrat versetzt wurde, hergestellt und untersucht wurden.

e) Basophile Leukocyten:

Für diese gilt das gleiche wie für die eosinophilen Leukocyten.

Zwischen gekreuzten Nicols :

a) Neutrophile Leukocyten :

Im gesamten Protoplasma fand ich feine bis mittelgroße doppelbrechende Strukturen. Im randständigen Protoplasma, kranzförmig angeordnet, treten nicht selten 6 bis 8 große doppelbrechende Körnchen mit Polarisationskreuz auf.

In manchen Zellen findet sich außerdem ein großes doppelbrechendes Körnchen, dessen Größe über der Norm liegt (ca. 4 Mikron). An diesem läßt sich oft kein Polarisationskreuz nachweisen. Seine Doppelbrechung ist intensiv weiß-gelblich; in Körnchen mit Polarisationskreuz rot-grün.

Über dem Polarisator bzw. Analysator allein betrachtet, leuchten die Grenzen dieses vakuolenartigen Gebildes rot-türkis auf. Das Zentrum ist hellblau.

In den erwähnten blaßblauen Zellschatten ist keine Doppelbrechung nachweisbar.

b) Lymphocyten :

Fast alle Lymphocyten weisen in ihrem Protoplasmasaum doppelbrechende Strukturen feiner und mittlerer Größe auf. Nicht so selten fand ich aber auch große doppel-

brechende Körnchen mit Polarisationskreuz; jedoch nicht mehr als höchstens ein solches großes Körnchen.

c) Monocyten :

In diesen fand ich feine doppelbrechende Strukturen und Körnchen mittlerer Größe, aber in wesentlich geringerer Anzahl als in den segmentkernigen Leukocyten. Selten fand ich große doppelbrechende Körnchen mit Polarisationskreuz und nie die erwähnten vakuolenähnlichen Gebilde.

d) Eosinophile Leukocyten :

In ihnen fanden sich doppelbrechende Strukturen aller drei Größenordnungen, jedoch Körnchen mittlerer Größe und große Körnchen nur vereinzelt. Auch die feinen doppelbrechenden Strukturen sind in geringerer Anzahl vorhanden als in den segmentkernigen Leukocyten.

e) Basophile Leukocyten :

Sie lassen keinen Unterschied erkennen gegenüber jenen basophilen Leukocyten, die ich in Blutausstrichen fand, welche von Blut ohne Ribonucleasezusatz hergestellt waren.

7.) Auszählung der doppelbrechenden Strukturen an supravital mit Toluidinblau gefärbten granulierten Leukocyten nach Zusatz von Ribonuclease.

Da ich den Eindruck hatte, daß bei Zusatz einer Ribonucleaselösung zu frisch entnommenem Blut eine Vermehrung der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten des peripheren Blutes sattfindet, nahm ich an 16 Blutausstrichen Auszählungen vor.

Wie aus den nachfolgenden Tabellen ersichtlich, zeigt sich ein vermehrtes Auftreten der doppelbrechenden Strukturen aller drei Größenordnungen, vor allem aber im Bereich der großen doppelbrechenden Körnchen.

Auszählungsergebnisse (in %) nach Zusatz von 1 ml Natrium-Citrat zu 4 ml Blut.

	ART DER DOPPELBRECHUNG		
Proband Nr.	fein + mittel	grob	Basophile Leukocyten
1	83.5 %	15.5 %	1.0 %
2	68.5 %	30.5 %	1.0 %
3	75.0 %	25.0 %	0.0 %
4	74.5 %	25.5 %	0.0 %
5	72.0 %	27.5 %	0.5 %
6	73.0 %	27.0 %	0.0 %
7	77.0 %	24.5 %	0.5 %
8	79.5 %	19.0 %	1.5 %
9	75.5 %	23.0 %	1.5 %
10	74.0 %	24.0 %	2.0 %
11	84.0 %	16.0 %	0.0 %
12	81.5 %	18.0 %	0.5 %
13	76.5 %	22.5 "	1.0 %
14	80.0 %	33.0 %	0.5 %
15	66.5 %	33.5 %	0.0 %
16	78.5 %	20.0 %	1.5 %
17	85.0 %	14.0 %	1.0 %
18	84.0 %	15.0 %	1.0 %
19	66.0 %	33.5 %	0.5 %
20	93.0 %	65.0 %	0.5 %

Auszählungsergebnisse (in %) nach Zusatz von 1 ml Ribonucleaselösung zu 4 ml Blut.

Proband Nr.	A R T D E R D O P P E L B R E C H U N G		
	fein + mittel	grob	Basophile Leukocyten
1	69.0 %	30.0 %	1.0 %
2	78.0 %	22.5 %	1.5 %
3	73.0 %	26.5 %	0.5 %
4	61.0 %	38.5 %	0.5 %
5	64.5 %	35.0 %	0.5 %
6	61.0 %	38.0 %	1.0 %
7	70.5 %	29.0 %	0.5 %
8	69.0 %	31.0 %	0.0 %
9	65.6 %	33.0 %	1.0 %
10	63.0 %	36.0 %	1.0 %
11	73.0 %	27.0 %	0.0 %
12	60.0 %	39.0 %	1.0 %
13	75.5 %	22.5 %	2.0 %
14	75.5 %	24.5 %	0.0 %
15	71.5 %	28.0 %	0.5 %
16	66.0 %	32.0 %	2.0 %
17	73.5 %	25.0 %	1.5 %
18	81.0 %	17.0 %	2.0 %
19	76.0 %	23.5 %	0.5 %
20	86.0 %	11.0 %	2.0 %

M I T T E L W E R T E I N %

Art der Doppelbrechung	Natrium-Citrat	Ribonuclease
fein + mittel	78.1 %	70.5 %
grob	21.2 %	28.5 %
Basophile Leukocyten	0.7 %	1.0 %

8.) Berechnung der Signifikanz des Unterschiedes der Anzahl doppelbrechender Körnchen zwischen Leukocyten mit und ohne Ribonucleasebehandlung.

Es seien :

$D = X_1 - X_2$	die Differenz zwischen den Einzelwerten des Paares
$\bar{X}_D$	der Mittelwert der Differenzen zwischen des Anteilen des Paares
S_D	die Standardabweichung der Differenzen
$S_{\bar{X}_D}$	die geschätzte Streuung des Mittelwertes der Differenz
t	$\bar{X}_D / S_{\bar{X}_D}$

I.) Berechnung des Mittelwertes der Differenzen ($\bar{X}_D$) zwischen den Einzelwerten eines Paares (X_1, X_2)

Auftreten großer doppelbrechender Körnchen nach Zugabe von Natrium-Citrat bzw. Ribonucleaselösung.

Nummer	X_1	X_2	$D_{X_1-X_2}$	D^2
1	15.5	30.0	- 14.5	210.25
2	25.0	26.5	- 1.5	2.25
3	25.5	38.5	- 13.0	169.0
4	27.5	35.0	- 7.5	56.25
5	27.0	38.0	- 11.0	121.0
6	24.5	29.0	- 4.5	20.25
7	19.0	31.0	- 12.0	144.0
8	23.0	33.0	- 10.0	100.0
9	24.0	36.0	- 12.0	144.0
10	16.0	27.0	- 11.0	121.0
11	18.0	39.0	- 21.0	441.0
12	22.5	22.5	0.0	0.0
13	20.0	32.0	- 12.0	144.0
14	14.0	25.0	- 11.0	121.0
15	15.0	17.0	- 2.0	4.0
16	6.5	11.0	- 4.5	20.25
Σ 16	323.0	470.5	- 147.5	1818.25

$X_D = \frac{\Sigma D}{N}$ $\quad \Sigma D^2 = 1818.25$

$\Sigma D = 147.5$ $\quad N-1 = 15$

$N = 16$ $\quad \frac{\Sigma D^2}{N-1} = 121.21666$

$X_D = 9.21875$

II.) Schätzung der Standard-Abweichung der Differenzen (S_D)

$$S_D = \sqrt{\frac{\Sigma D^2}{N-1} - \frac{(\Sigma D)^2}{N(N-1)}}$$

$\frac{\Sigma D^2}{N-1} = 121.21666$

$(\Sigma D)^2 = 1818.25$ $\quad S_D^2 = 113.640619$

$N(N-1) = 240$ $\quad S_D = 10.64$

$\frac{\Sigma D^2}{N(N-1)} = 7.576041$

III.) Schätzung der Streuung des Mittelwertes der Differenzen.

$S_{\bar{X}_D} = \frac{S_D}{\sqrt{N}}$ $\quad S_D = 10.64$

$\sqrt{N} = 4$ $\quad S_{\bar{X}_D} = 2.66$

IV. Berechnung von t

$t = \bar{X}_D / S_{\bar{X}_D}$ $\quad \bar{X}_D = 9.21875$

$S_{\bar{X}_D} = 2.66$ $\quad t = 3.4656954$

V.) Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Eintreffens der Resultate : 96%

$n = N - 1$

$n = 15$

$p = 0.005 > p > 0.001$

Auftreten feiner Körnchen und Körnchen mittlerer Größe nach Zugabe von Natrium-Citrat bzw. Ribonucleaselösung.

I.) Berechnung des Einzelwertes der Differenzen ($\overline{X}_D$) zwischen den Einzelwerten eines Paares (X_1 ; X_2)

Nummer	X_1	X_2	$D_{X_1 - X_2}$	D^2
1	83.5	69.0	+ 14.5	210.25
2	75.0	73.0	+ 2.0	4.0
3	74.5	61.0	+ 13.5	182.25
4	72.0	64.5	+ 7.5	56.25
5	73.0	61.0	+ 12.0	144.0
6	77.0	70.5	+ 6.5	42.25
7	79.5	69.0	+ 10.0	100.0
8	75.5	65.6	+ 9.9	98.01
9	74.0	63.0	+ 11.0	121.0
10	84.0	73.0	+ 11.0	121.0
11	81.5	60.0	+ 21.0	441.0
12	76.5	75.5	+ 1.0	1.0
13	78.5	66.0	+ 12.5	156.25
14	85.0	73.5	+ 11.5	132.25
15	84.0	81.0	+ 3.0	9.0
16	93.0	86.0	+ 7.0	49.0
Σ 16	1266.5	1111.6	+ 153.9	1867.51

$$\overline{X}_D = \frac{\Sigma D}{N}$$

ΣD = 153.9

N = 16

ΣD^2 = 1867.51

N - 1 = 15

$$\frac{\Sigma D^2}{N - 1} = 124.50066$$

$\overline{X}_D$ = 9.61875

II.) Schätzung der Standard-Abweichung der Differenzen (S_D) .

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum D^2}{N-1} - \frac{(\sum D)^2}{N(N-1)}} \qquad S_D^2 = 116.719369$$

$$\frac{\sum D^2}{N-1} = 124.50066 \qquad S_D = 10.79$$

$$N(N-1) = 240 \qquad \frac{\sum D^2}{N(N-1)} = 7.781291$$

III.) Schätzung der Streuung des Mittelwertes der Differenzen.

$$S_{\bar{X}_D} = \frac{S_D}{\sqrt{N}} \qquad S_D = 10.79$$

$$\sqrt{N} = 4 \qquad S_{\bar{X}_D} = 2.6975$$

IV.) Berechnung von t

$$t = \bar{X}_D / S_{\bar{X}_D} \qquad \bar{X}D = 9.61875$$

$$S_{\bar{X}_D} = 2.6975 \qquad t = 3.5658016$$

V.) Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Eintreffens der Resultate: 97%

$n = N - 1$
$n = 15$
$p = 0.005 > p > 0.001$

9.) Beeinflußbarkeit der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten durch äußere Einwirkungen :

a) Osmiumtetroxyd :

Blutausstriche wurden in der Kammer der Einwirkung von Osmiumtetroxyddämpfen ausgesetzt, wobei ein vollkommener Schwund der Doppelbrechung im Protoplasma der Leukocyten festgestellt wurde.

b) Wasser :

Auftropfen von Wasser auf die Objektträgerausstriche führte zu einem sofortigen Verschwinden der Doppelbrechung im Protoplasma der Leukocyten mit Ausnahme der basophilen Zellen, deren doppelbrechende Strukturen unverändert erhalten blieben.

c) Physiologische Kochsalzlösung :

Auch hier kam es zu einem sofortigen Verschwinden der Doppelbrechung in den weißen Blutkörperchen. Nur in den basophilen Leukocyten blieb die Doppelbrechung vollkommen unverändert erhalten.

d) Fixation durch Hitzeeinwirkung :

Nach mehrmaligem Durchziehen der Ausstrichpräparate durch eine Flamme, blieb die Doppelbrechung im Protoplasma der Leukocyten unverändert erhalten.

10 .) Untersuchung der an gequetschten Zellkernen auftretenden Doppelbrechung :

Durch den bei Herstellung eines Ausstrichpräparates nicht ganz zu vermeidenden Druck, fand ich an den granulierten Leukocyten, deren Kerne durch den Vorgang des Ausstreichens traumatisiert worden waren, folgende Veränderungen:

Hellfeld :

Im Hellfeld erscheinen die geschädigten granulierten Leukocyten als unregelmäßig begrenzte Protoplasmaklümpchen, in welchen der Kern als schwach rötlicher unscharf begrenzter Fleck sichtbar ist. Das Protoplasma erscheint stark granuliert, die Farbe der Granula ist blau-schwarz.

Zwischen gekreuzten Nicols :

In den solcherart veränderten granulierten Leukocyten fand ich eine massive Doppelbrechung, die sich nicht nur auf das Protoplasma der weißen Blutkörperchen beschränkt, sondern sich auch an jener Stelle findet, an welcher sich der im Hellfeld nicht mehr oder nur andeutungsweise sichtbare Kern findet. Bei Kompensation im positiven Drehsinn sieht man den Kern grün aufleuchten, das umgebende Protoplasma gelb und in den randständigen Partien sind bisweilen noch zwei grüne parallel zueinander verlaufende Streifen feststellbar.

Ist der Kern im Hellfeld nicht mehr zu erkennen, so erfolgt bei Betrachtung zwischen gekreuzten Nicols eine Unterteilung der Zelle in Quadran-

ten derart, daß der rechte obere und linke untere Quadrant grün, der rechte untere und linke obere Quadrant gelb aufleuchten.

Ferner fand ich geschädigte weiße Blutkörperchen, welche diffus über der ganzen Zelle eine grüne oder gelbe Doppelbrechung zeigen.

Schließlich treten auch gequetschte Leukocyten auf, die keine oder nur eine geringfügige Doppelbrechung zeigen. Hierbei handelt es sich um Leukocyten mit weit fortgeschrittenen Untergangserscheinungen.

D I S K U S S I O N :

Mittels der vorliegenden Untersuchungen wurde überprüft, ob durch Einlagerung eines doppelbrechenden und dichroitischen Farbstoffes in gerichtete Strukturen der Leukocyten des peripheren Blutes Anisotropie erzeugt werden kann.

Bei Durchforschung der Literatur findet sich kein Hinweis, daß derartige Untersuchungen an den Leukocyten bereits durchgeführt worden seien.

CONTIER berichtet zwar über die Vitalfluorochromierung des menschlichen Blutes und Knochenmarks mit Acridinorange, wobei es ihm gelang auf Grund einer auftretenden Rot - Grün - Fluoreszenz eine Differenzierung zwischen gealterten und noch voll leistungsfähigen weißen Blukörperchen durchzuführen. Nachteile dieser Methode sind, daß eine Unterscheidung zwischen eosinophilen, basophilen und neutrophilen Leukocyten nicht möglich ist und eine Darstellung der intracellulären Granula sowie der Mitochondrien nicht gelingt.

Bei Färbung der Leukocyten mit einem doppelbrechenden und dichroitischen Farbstoff, als welchen sich uns u.a. Toluidinblau anbietet, dessen optisches Verhalten von MISSMAHL untersucht wurde, haben wir die Vorteile einer guten färberischen

Darstellung aller intracellularen, im Lichtmikroskop mit der uns zur Verfügung stehenden Optik sichtbaren Strukturen, sowie die Erzeugung von Anisotropie in den Leukocyten.

Letztere wird erzeugt durch Einlagerung der Farbstoffmoleküle in gerichtete Strukturen der Leukocyten (MISSMAHL). Die von mir im Protoplasma der Leukocyten gefundenen doppelbrechenden Strukturen in Form von feinen Körnchen, Körnchen mittlerer Größe und großen Körnchen treten in sämtlichen Leukocyten auf, wobei die Körnchen feiner und mittlerer Größe nach ihrer Feinstruktur den basophilen Granula zu entsprechen scheinen. Die großen Körnchen hingegen könnten identisch sein mit Vakuolen im Protoplasma der Leukocyten, deren Entstehung man in der feuchten Kammer verfolgen kann, wobei sich meine Beobachtungen mit jenen von PHILIPSBORN decken. PHILIPSBORN führt die Entstehung von Vakuolen im Protoplasma der Leukocyten auf folgende Ursachen zurück :

Zeichen sekretorischer Funktion
Ansammlungsorte von Stoffwechselprodukten
Eingeschlossene Fremdkörper
Folge einer Schädigung

Auch ich fand Vakuolen, welche im polarisierten Licht eine starke Doppelbrechung zeigen, nicht nur an geschädigten Zellen oder solchen die Fremdkörpereinschlüsse enthielten. - SCHULTEN erwähnt die von WEIGELT und NÄGELI gemachte Feststellung, daß es bei Erkrankungen mit schweren Leberzellschädigungen zur Neutrophilen-

vakuolisierung komme. Dies würde mit meinen Beobachtungen übereinstimmen, daß im Protoplasma der Leukocyten bei Lebererkrankungen zahlreiche große Körnchen mit Polarisationskreuz zu finden sind.

Geschädigte Zellen zeigen zumeist nicht das Bild wohlabgegrenzter großer doppelbrechender Körnchen, sondern eine starke diffuse Doppelbrechung über der ganzen Zelle bzw. ein völliges Verschwinden der doppelbredhenden Strukturen. - Im ersteren Fall nimmt MISSMAHL an, daß durch Quetschung der Leukocyten, wie sie im Ausstrichpräparat nicht immer vermeidbar ist und von mir in der feuchten Kammer durch Druck auch künstlich herbeigeführt wurde, eine bessere Ausrichtung der Feinstruktur und somit gerichtete Einlagerung der Farbstoffteilchen erfolgt.

Völliges Verschwinden der Doppelbrechung scheint mit dem "Tod" der Zelle verbunden zu sein. An solchen Leukocyten fand ich die gleichen Veränderungen wie sie von PHILIPSBORN beschrieben werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bei Zusatz von Ribonuclease zu dem zu untersuchenden Blut ein vermehrtes Auftreten der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Zellen zu finden ist. Besonders häufig fanden sich dabei große doppelbrechende Körnchen mit deutlich ausgebildetem Polarisationskreuz und sehr oft randständige, bisweilen in einem Protoplasmaausläufer gelegene, fast kreisrunde, etwa 4 Mikron große Gebilde. Zwischen gekreuzten Nicols zeigen sie stärkste weißgelbliche Doppelbrechung. Ein Polarisationskreuz ist nicht zu erkennen. Bei Betrachtung

dieser vakuolären Gebilde verstärkt sich der bereits bei Betrachtung der großen Körnchen mit Polarisationskreuz gewonnene Eindruck, daß die doppelbrechenden Strukturen kugelschalenförmig gelagert sind.

Über die Verwendung von Ribonuclease in der Hämatologie berichten u.a. THOMA und TOBIASCH. TOBIASCH beobachtet unter der Einwirkung von Ribonuclease eine Abnahme der Plasmabasophilie. Diese Abnahme der Plasma basophilie konnte ich zwar auch beobachten und zugleich feststellen, daß damit ein Schwund der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten verbunden war. Vorwiegend zeigte sich jedoch eine starke Zunahme von basophilen Granula. In dem abgerundeten Zelleib lagen große blauschwarze Granula, die sich häufig zu einem perlschnurartigen Saum um die von mir beobachteten vakuolären Gebilde anordneten. - In den wenigen Fällen in denen der von THOMA und TOBIASCH beschriebene Abbau des Kernchromatingerüstes ebenfalls vermehrt beobachtet werden konnte, fand ich in den Leukocytenschatten keine Doppelbrechung mehr. In der überwiegenden Zahl der Fälle bestand zwar eine zum Teil starke Quellung des Protoplasmas und des Kernes, doch färbten sich Protoplasma, Kern und Granula intensiv an.

Im Kern selbst trat bei dieser Methode keine Doppelbrechung auf. Sie entsteht lediglich bei stark gequetschten Zellen (MISSMAHL) und ganz selten in der feuchten Kammer sowie bei Aufbringen von Wasser auf einen Objektträgerausstrich. Im ersten Falle führt die Ausrichtung der Feinstruktur durch Druck, im letzteren Fall die Quellung des Kernes zur gerichteten Einlage-

rung der Farbstoffteilchen und somit zur Erzeugung von Anisotropie.

Was nun die Schädigung der Leukocyten und dem damit verbundenen Ansteigen und schließlichen Absinken der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten betrifft, so ist dazu folgendes zu sagen : Entfernt man die Leukocyten aus der Blutbahn und setzt sie somit unphysiologischen Umweltsbedingungen aus, so treten nach drei Stunden (PHILIPSBORN) starke Degenerationserscheinungen an den weißen Blutkörperchen auf, die schließlich zum Untergang der Zelle führen. Solche Degenerationserscheinungen sind : Vakuolenbildung, Aufhören der amöboiden Beweglichkeit, verstärkte Brown'sche Molekularbewegung im Protoplasma, Körnchenverklumpung, Körnchenschwund, Abblassen und Auflösung des Kernes.

Unter der Farbstoffeinwirkung laufen die degenerativen Veränderungen beschleunigt ab. Nach Ablauf einer Stunde beginnt der Zellzerfall, um nach zwei Stunden seinen Höhepunkt zu erreichen. Bei Steigerung der Farbstoffkonzentration fand ich bereits nach 30 Minuten 50% geschädigter Zellen. Gleichzeitig kam es zu einer steten Zunahme der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten. Durch das Eindringen der Farbstoffmoleküle - durch Diffusion und Phagocytose - und Ablagerung in gerichtete Strukturen erzeugte ich zunächst eine Doppelbrechung, die sich vor allem in Form feiner Körnchen und Körnchen mittlerer Größe zeigt. Durch Farbstoffablagerung in bereits

vorhandenen Vakuolen (PHILIPSBORN) werden diese im polarisierten Licht als große doppelbrechende Körnchen sichtbar. Durch den Fremdkörperreiz der Farbstoffmoleküle wird die sekretorische Tätigkeit der Zelle angeregt, wodurch Vakuolenbildung und vermehrtes Auftreten doppelbrechender Strukturen im Protoplasma der Leukocyten erklärbar sein dürfte. Durch den zunehmenden Sauerstoffmangel, der die Zellatmung beeinträchtigt und u.a. zur Degeneration führt, kommt es schließlich zur groben Störung der Stoffwechselvorgänge in der Zelle mit nachfolgendem Zelluntergang und Auflösung der gerichteten Strukturen, welche Vorbedingung für das Entstehen von Anisotropie sind. Damit finden wir im polarisierten Licht nur noch ein schwach angefärbtes Protoplasmaklümpchen oder einen leeren Leukocytenschatten, die jede Doppelbrechung vermissen lassen.

Zusatz von Ribonuclease führt zur Auflösung der Chromatinstruktur der Leukocyten. Andererseits aber muß es zur vermehrten Vakuolenbildung und zur Entstehung gerichteter Strukturen in der Zelle kommen, wie die auffallende Zunahme der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten zeigt.

Besonders reich an Ribonucleinsäure sind die Mikrosomen. In geringerer Menge enthalten auch die Mitochondrien und das Hyaloplasma Ribonucleinsäure (TOBIASCH). Es ist denkbar, daß bei Zusatz von Ribonuclease Abbauprodukte entstehen, in welche die Farbstoffmoleküle gerichtet eingelagert werden und

somit nicht nur die Vakuolen sondern auch Mikrosomen und Mirochondrien polarisationsmikroskopisch zur Darstellung gelangen.

Untersuchungen an Blutausstrichen von 20 gesunden männlichen und weiblichen Probanden zeigten ein Überwiegen der feinen Körnchen und Körnchen mittlerer Größe. Im Blut der männlichen Probanden lag die Zahl der großen doppelbrechenden Körnchen höher als bei den weiblichen. Normalwerte lassen sich aufstellen.

Untersuchungen am Blut von Patienten, die an Filiriasis, Bronchopneumonie, Morbus Pfeifer, Koma diabeticum, Dickdarmcarcinom, perforierender Appendicitis und Hepatitis chronica erkrankt waren, zeigten vor allem bei Vorliegen einer Stressituation ein Absinken der feinen Körnchen und eine Zunahme der Körnchen mittlerer Größe und der großen Körnchen.

, Versuche zur Fixierung der doppelbrechenden Strukturen im Protoplasma der Leukocyten mit Osmiumsäure (ROMEIS) schlugen fehl. - Dagegen zeigte sich bei Hitzefixation ein unverändertes Bestehenbleiben der doppelbrechenden Strukturen.

Zusammenfassung

Um zu klären, ob bei Einlagerung eines doppelbrechenden und dichroitischen Farbstoffes in gerichtete Strukturen der Leukocyten im peripheren Blut Anisotropie in diesen Zellen erzeugt werden kann, wurden Supravitalfärbungen mit Toluidinblau an menschlichem Blut durchgeführt.

Dabei ergab sich, daß mit der angewandten Technik in allen Leukocyten doppelbrechende Körnchen entstanden.

Die Bildung dieser anisotropen Strukturen ist von der Färbezeit und der Färbedauer abhängig. Dies wurde in verschiedenen Kurven dargestellt. Bei einer Färbezeit von einer Stunde und der Zugabe von 1 ml einer 0.5%igen Toluidinblaulösung zu 4 ml Citratblut ergaben sich für das Auftreten dieser doppelbrechenden Strukturen in den Leukocyten reproduzierbare Werte. Dabei zeigte sich, daß im Protoplasma der Leukocyten gegeneinander abgrenzbare kleine, mittlere und große anisotrope Körperchen entstehen, deren optische Eigenschaften im einzelnen ausführlich beschrieben sind. Hierdurch wurde es möglich, die Stärke der Doppelbrechung in jedem einzelnen Leukocyten quantitativ zu erfassen und für den gesunden Menschen Normalwerte der Doppelbrechung in den segmentkernigen Leukocyten aufzustellen. Außerdem zeigte sich, daß die segment-

kernigen, die eosiniphilen und basophilen Leukocyten sowie die Lymphocyten und Monocyten jeweils in typischscher Weise sich anders verhalten.

Die doppelbrechenden Strukturen in den Leukocyten sind am Ausstrichpräparat gegenüber äußeren Einflüssen sehr empfindlich. Sie werden durch Wasser, Kochsalzlösung und Osmiumtetroxyd zerstört. Dagegen werden sie durch Wärmefixytion nicht verändert.

Zugabe von Ribonucleaselösung während des Färbevorganges zu frisch entnommenem Venenblut verstärkt die Doppelbrechung der einzelnen Zellen signifikant.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1.) CONTIER L. Die Vitalfluorochromierung des menschlichen Blutes und Knochenmarks mit Acridinorange. Blut , 2 , 277-287 (1956).

2.) MISSMAHL H.P. Metachromasie durch gerichtete Zusammenlagerung von Farbstoffteilchen erläutert am optischen Verhalten des Toluidinblau. Histochemie 3 , 396-412 (1964).

3.) PHILIPSBORN v.E. Über die Nekrobiose der Leukocyten gesunder und kranker Menschen im Quarzdeckglaspräparat. Dtsch. Arch. klin. Med. 155 , 186-198 (1927).

4.) ROMEIS B. Taschenbuch der mikroskopischen Technik. 14. Aufl. R. Oldenbourg-Verlag 1943 , p. 93.

5.) SCHMIDT F.O., R.S. BEAR, E. PONDER I.Cellul.comp. Physiol. 11 , 309 (1938). Zit. bei : RUHENSTRODT G.: "Die Struktur der Säugetiererythrocyten" p. 210-228 in HEILMEYER L., A. HITTMAIR : "Handbuch der gesamten Hämatologie" Urban und Schwarzenberg 1957

6.) SCHULTEN H. "Lehrbuch der klinischen Hämatologie" Georg Thieme Verlag 1953.

7.) THOMA K. Über die Verwendung von Ribonuclease (Brachet-Test) in der hämatologischen Diagnostik.
Acta haematol. 4 , 81-85 (1950).

8.) TOBIASCH V. Über die Anwendung cytochemischer Methoden in der Hämatologie.
Folia haematol. 79 , 133-222 (1962).

L e b e n s l a u f

Am 22.1.1939 wurde ich in Haida, Kr.Böhm.Leipa, Nordböhmen, als Tochter des Guntram Gampe und der Dr. Hildegard Gampe geborenen Lebeda geboren.

Ich besuchte die Grundschule von 1945-1949 in Bobbau, Kr. Dessau, Sachsen-Anhalt. Von 1949-1957 besuchte ich in Graz das Realgymnasium und legte hier am 6.6.1957 die Reifeprüfung ab. Am 14.10.1957 immatrikulierte ich an der Universität Graz an der Medizinischen Fakultät und legte hier am 14.10.1960 das I.Rigorosum (Physicum) ab. Im Sommersemester 1961 war ich an der Universität Tübingen, im Wintersemester 1961/62 an der Universität Göttingen immatrikuliert. Vom Sommersemester 1962 an bis zum Sommersemester 1964 war ich ununterbrochen an der Universität Tübingen immatrikuliert und legte hier am 11.12.1964 die ärztliche Prüfung ab. Vom 1.4.1965 bis 30.9.1965 war ich als Medizinalassistentin am Städt. Krankenhaus Singen/Hohentwiel tätig. Seit 1.11.1965 bin ich in der gleichen Eigenschaft am St.Johannes-Hospital in Duisburg-Hamborn beschäftigt.